

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

VIAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR NO HIPOCAMPO ENVOLVIDAS NA RESPOSTA AO
ESTRESSE PRODUZIDA POR CHUMBO E CÁDMIO

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Bainy Leal

Fabiano Mendes de Cordova
Departamento de Bioquímica – CCB – UFSC

Fevereiro de 2002



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

VIAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR NO HIPOCAMPO ENVOLVIDAS NA RESPOSTA AO
ESTRESSE PRODUZIDA POR CHUMBO E CÁDMIO

Trabalho apresentado como requisito parcial para obtenção do título de
Mestre em Neurociências

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Bainy Leal

Fabiano Mendes de Cordova
Departamento de Bioquímica – CCB – UFSC

Fevereiro de 2002

**“SINALIZAÇÃO CELULAR NO HIPOCAMPO EM RESPOSTA AO ESTRESSE
PRODUZIDA POR CHUMBO E CÂDMIO”.**

FABIANO MENDES DE CORDOVA

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM NEUROCIÊNCIAS

na área de Neurofisiologia e Comportamento Aprovada em sua forma final
pelo Programa de Pós-Graduação em Neurociências.

Orientador



Rodrigo Bainy Leal

Coordenadora do Curso

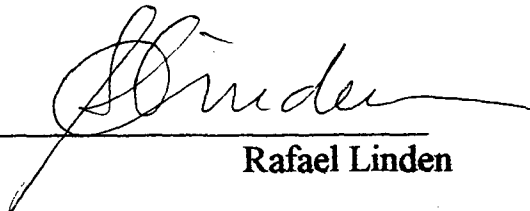


Yara Maria Rauh Müller

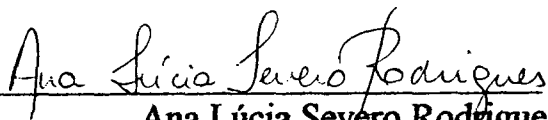
Banca Examinadora



Rodrigo Bainy Leal (Presidente)



Rafael Linden



Ana Lúcia Severo Rodrigues

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Ser supremo pelas oportunidades da vida

Agradeço ao meu orientador Rodrigo, pela sua orientação, amizade e exemplo de dedicação e principalmente por ter me apresentado à pesquisa, sendo a pessoa mais importante para o início da minha vida científica.

Aos meus pais, muito obrigado.

Agradeço à Clarissa por dividir os bons momentos, pelo incentivo e auxílio na carreira e por ser a criatura mais amável que já conheci.

Ao sogro Dalcídio e à sogra Ilacir pelo grande carinho e apoio.

À professora Ana Lúcia Severo Rodrigues, pela amizade e auxílio na estruturação do trabalho.

Agradeço à professora Carla Inês Tasca pelos auxílios técnicos e amizade.

Ao professor Peter R. Dunkley pelo fornecimento de alguns materiais e pelas sugestões críticas ao trabalho.

Aos professores Hernán Terenzi e Boris Stanbuk pelo empréstimo de alguns equipamentos e materiais e acima de tudo pela amizade.

À professora Rosângela Curi Pedrosa pelo fornecimento de espaço físico no biotério.

Agradeço ao professor André Avelino Pasa pelo fornecimento de água Milli Q.

Ao professor Nelson Gabilan, pela amizade.

A todos os esforçados trabalhadores do laboratório pela boa convivência e companheirismo: Tiago, Simone, Helena, Carine, Rossana, Cristiane, Patrícia, Maurício, Fernanda, Talise, Guilherme e Deise. E especialmente, às colegas da nossa equipe, Patrícia e Ana Paula.

Aos professores da Pós-graduação em Neurociências, pelo apoio e dedicação nos cursos ministrados.

Ao Nivaldo, secretário da Pós-graduação em Neurociências, pela sua dedicação aos alunos.

À CAPES pela bolsa que financiou pelo menos parte do período do curso.

Ao FUNPESQUISA – UFSC e ao CNPq pelos auxílios financeiros.

Ao Biotério Central da UFSC, pelo fornecimento dos animais utilizados neste trabalho.

SUMÁRIO

| | |
|--|------|
| LISTA DE FIGURAS | VIII |
| LISTA DE ABREVIATURAS | XI |
| RESUMO | XIII |
| ABSTRACT | XV |
| 1- INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1- METAIS PESADOS | 1 |
| 1.2- SINALIZAÇÃO CELULAR | 3 |
| 1.2.1- Fosforilação de Proteínas | 4 |
| 1.2.2- MAPK | 6 |
| 1.3- METAIS E SINALIZAÇÃO CELULAR | 10 |
| 1.4- RESPOSTAS DE ESTRESSE | 11 |
| 1.5- MÉTODOS DE ESTUDO PARA ABORDAGENS NEUROQUÍMICAS | 13 |
| 1.6- JUSTIFICATIVA | 15 |
| 2- OBJETIVOS | 16 |
| 2.1- OBJETIVO GERAL | 16 |
| 2.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 16 |
| 2.2.1- Padronização da metodologia de “Western Blotting” | 16 |
| 2.2.2- Efeitos do chumbo e cádmio <i>in vitro</i> | 16 |
| 2.2.3- Efeitos do chumbo e cádmio <i>in vivo</i> | 17 |
| 3- MATERIAIS E MÉTODOS | 18 |
| 3.1- ANIMAIS | 18 |

| | |
|--|----|
| 3.2- MATERIAS | 18 |
| 3.3- EQUIPAMENTOS | 19 |
| 3.4- PREPARAÇÃO DE FATIAS HIPOCAMPAS | 20 |
| 3.5- PREPARAÇÃO DE FRAÇÃO SINAPTOSSOMAL | 20 |
| 3.6- EXPOSIÇÃO AO CHUMBO E CÁDMIO <i>IN VITRO</i> | 21 |
| 3.7- EXPOSIÇÃO AO CHUMBO E CÁDMIO <i>IN VIVO</i> | 22 |
| 3.8- AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MITOCONDRIAL E VIABILIDADE CELULAR | 22 |
| 3.9- SEPARAÇÃO DE PROTEÍNAS | 23 |
| 3.10- ELETROTRANSFERÊNCIA E IMUNODETECÇÃO | 25 |
| 3.11- DOSAGEM DE PROTEÍNA..... | 29 |
| 3.12- ANÁLISE ESTATÍSTICA | 29 |
| 4- RESULTADOS | 30 |
| 4.1- ESTUDOS DOS EFEITOS DE CHUMBO E CÁDMIO <i>IN VITRO</i> UTILIZANDO FATIAS HIPOCAMPAS DE RATOS JOVENS..... | 32 |
| 4.1.1- Avaliação da Viabilidade Celular em Fatias Hipocampais Expostas ao Chumbo ou Cádmio | 32 |
| 4.1.1.1- Determinação da Viabilidade Celular em Fatias de Hipocampo de Ratos Jovens Incubadas in vitro com Diferentes Concentrações de Chumbo ou Cádmio..... | 32 |
| 4.1.1.2- Efeito da Inibição de p38 ^{MAPK} pelo SB203580 em Fatias Hipocampais de Ratos Jovens Expostas in vitro ao Cádmio | 34 |
| 4.1.2- Determinação da Fosforilação de MAPKs por Chumbo e Cádmio..... | 36 |
| 4.1.2.1- Análise da Fosforilação de ERK1/2 em Fatias de Hipocampo de Ratos Jovens Incubadas com Chumbo ou Cádmio in vitro..... | 36 |
| 4.1.2.2- Análise da Fosforilação de p38 ^{MAPK} em Fatias de Hipocampo de Ratos Jovens Incubadas com Chumbo ou Cádmio in vitro..... | 41 |
| 4.1.3- Determinação do Imunoconteúdo de HSPs em Resposta aos Metais..... | 46 |
| 4.2- ESTUDOS DOS EFEITOS DE CHUMBO E CÁDMIO <i>IN VITRO</i> UTILIZANDO FATIAS E SINAPTOSSOMAS DE RATOS ADULTOS | 49 |
| 4.2.1- Análise da Viabilidade Celular em Fatias de Hipocampo de Ratos Adultos Expostas aos Metais..... | 49 |
| 4.2.2- Análise da Viabilidade de Sinaptossomas Expostos ao Chumbo..... | 51 |

| | |
|---|----|
| 4.3- ESTUDOS DOS EFEITOS DE CHUMBO E CÁDMIO EM FATIAS HIPOCAMPAIS DE RATOS JOVENS EXPOSTOS <i>IN VIVO</i> | 53 |
| 4.3.1- Controle do Ganho de Peso Corporal dos Animais Tratados com Chumbo e Cádmio | 53 |
| 4.3.2- Avaliação da Viabilidade Celular em Fatias Hipocampais Obtidas de Ratos Expostos ao Chumbo ou Cádmio | 55 |
| 4.3.3- Determinação da Fosforilação de MAPKs em Fatias de Hipocampo | 57 |
| 4.3.3.1- Análise da Fosforilação de ERK1/2 em Fatias de Hipocampo de Ratos Jovens Tratados com Chumbo ou Cádmio <i>in vivo</i> | 57 |
| 4.3.3.2- Análise da Fosforilação de p38 ^{MAPK} em Fatias de Hipocampo de Ratos Jovens Tratados com Chumbo ou Cádmio <i>in vivo</i> | 60 |
| 4.3.4- Avaliação do Conteúdo de HSPs, PP1 e PP2A em Fatias Hipocampais | 63 |
| 5- DISCUSSÃO | 66 |
| CONCLUSÕES | 74 |
| PERSPECTIVAS | 76 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 78 |
| ANEXOS | 91 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 01- Diagrama esquemático do sistema de fosforilação de proteínas..... | 4 |
| Figura 02- Cascata de sinalização das MAPKs..... | 6 |
| Figura 03- Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida contendo SDS, corada com Coomassie Blue. Amostras de fatias de hipocampo de ratos jovens. | 25 |
| Figura 04- Membrana de nitrocelulose corada com Ponceau após eletrotransferência das proteínas..... | 26 |
| Figura 05- Gel de poliacrilamida correspondente à Figura 4 corado com Coomassie Blue após eletrotransferência..... | 27 |
| Figura 06- Imunodeteção, através de quimiluminescência, de um polipeptídeo usando anticorpo específico. | 28 |
| Figura 07- Efeito do chumbo (A) e cádmio (B) na redução do MTT em fatias de hipocampo de ratos jovens. | 33 |
| Figura 08- Efeito do SB203580 sobre a viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos jovens expostas ao cádmio. | 35 |
| Figura 09- Efeito do chumbo sobre a fosforilação de ERK1/2 em fatias de hipocampo de ratos jovens em incubações de 1 hora. (A) Immunoblotting mostrando as bandas de fosfo-ERK1/2. (B) Quantificação da fosforilação das bandas. | 37 |
| Figura 10- Efeito do chumbo sobre a fosforilação de ERK1/2 em fatias de hipocampo de ratos jovens em incubações de 3 horas. (A) Immunoblotting mostrando as bandas de fosfo-ERK1/2. (B) Quantificação da fosforilação das bandas. | 38 |
| Figura 11- Efeito do cádmio sobre a fosforilação de ERK1/2 em fatias de hipocampo de ratos jovens em incubações de 1 hora. (A) Immunoblotting mostrando as bandas de fosfo-ERK1/2. (B) Quantificação da fosforilação das bandas. | 39 |

| | |
|---|----|
| Figura 12- Efeito do cádmio sobre a fosforilação de ERK1/2 em fatias de hipocampo de ratos jovens em incubações de 3 horas. (A) Immunoblotting mostrando as bandas de fosfo-ERK1/2. (B) Quantificação da fosforilação das bandas. | 40 |
| Figura 13- Efeito do chumbo sobre a fosforilação de p38 ^{MAPK} em fatias de hipocampo de ratos jovens em incubações de 1 hora. (A) Immunoblotting mostrando as bandas de fosfo-p38 ^{MAPK} . (B) Quantificação da fosforilação das bandas. | 42 |
| Figura 14- Efeito do chumbo sobre a fosforilação de p38 ^{MAPK} em fatias de hipocampo de ratos jovens em incubações de 3 horas. (A) Immunoblotting mostrando as bandas de fosfo-p38 ^{MAPK} . (B) Quantificação da fosforilação das bandas. | 43 |
| Figura 15- Efeito do cádmio sobre a fosforilação de p38 ^{MAPK} em fatias de hipocampo de ratos jovens em incubações de 1 hora. (A) Immunoblotting mostrando as bandas de fosfo-p38 ^{MAPK} . (B) Quantificação da fosforilação das bandas. | 44 |
| Figura 16- Efeito do cádmio sobre a fosforilação de p38 ^{MAPK} em fatias de hipocampo de ratos jovens em incubações de 3 horas. (A) Immunoblotting mostrando as bandas de fosfo-p38 ^{MAPK} . (B) Quantificação da fosforilação das bandas. | 45 |
| Figura 17- Efeito do chumbo (A) e cádmio (B) sobre o imunoconteúdo de Hsp27 em fatias de hipocampo de ratos jovens em incubações de 3 horas. | 47 |
| Figura 18- Efeito do chumbo (A) e cádmio (B) sobre o imunoconteúdo de Hsp70 em fatias de hipocampo de ratos jovens em incubações de 3 horas. | 48 |
| Figura 19- Efeito do chumbo (A) e cádmio (B) na redução do MTT em fatias de hipocampo de ratos adultos. | 50 |
| Figura 20- Efeito do chumbo na redução do MTT em sinaptossomas de córtex (A) e hipocampo (B) de ratos adultos, em incubações de 20, 40 e 60 minutos. | 52 |
| Figura 21- Ganho de peso corporal dos animais tratados <i>in vivo</i> com chumbo (A) e cádmio (B). | 54 |
| Figura 22- Efeito do chumbo (A) e cádmio (B) na redução do MTT em fatias de hipocampo de ninhadas de ratos jovens tratados <i>in vivo</i> | 56 |
| Figura 23- Efeito do chumbo sobre a fosforilação de ERK1/2 em fatias de hipocampo de ratos jovens tratados <i>in vivo</i> . (A) Immunoblotting mostrando as bandas de fosfo-ERK1/2. (B) Immunoblotting mostrando o conteúdo de ERK1/2. (C) Quantificação da fosforilação das bandas. | 58 |
| Figura 24- Efeito do cádmio sobre a fosforilação de ERK1/2 em fatias de hipocampo de ratos jovens tratados <i>in vivo</i> . (A) Immunoblotting mostrando as bandas de fosfo-ERK1/2. (B) Immunoblotting mostrando o conteúdo de ERK1/2. (C) Quantificação da fosforilação das bandas. | 59 |
| Figura 25- Efeito do chumbo sobre a fosforilação de p38 ^{MAPK} em fatias de hipocampo de ratos jovens tratados <i>in vivo</i> . (A) Immunoblotting mostrando as bandas de fosfo-p38 ^{MAPK} . (B) | |

Imunoblotting mostrando o conteúdo de p38^{MAPK}. (C) Quantificação da fosforilação das bandas..... 61

Figura 26- Efeito do cádmio sobre a fosforilação de p38^{MAPK} em fatias de hipocampo de ratos jovens tratados *in vivo*. (A) Imunoblotting mostrando as bandas de fosfo-p38^{MAPK}. (B) Imunoblotting mostrando o conteúdo de p38^{MAPK}. (C) Quantificação da fosforilação das bandas..... 62

Figura 27- Conteúdo de Hsp27 (A) e Hsp70 (B) em fatias hipocampais de ratos jovens tratados *in vivo* com chumbo..... 63

Figura 28- Conteúdo de Hsp27 (A) e Hsp70 (B) em fatias hipocampais de ratos jovens tratados *in vivo* com cádmio..... 64

Figura 29- Conteúdo de PP1 (A) e PP2A (B) em fatias hipocampais de ratos jovens tratados *in vivo* com chumbo..... 65

LISTA DE ABREVIATURAS

1. AMP: monofosfato de adenosina
2. AMPc: monofosfato de adenosina cíclico
3. AP-1: proteína ativadora 1
4. ATP: trifosfato de adenosina
5. BCIP: 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
6. BSA: albumina sérica bovina
7. CaMK: proteína quinase cálcio/calmodulina dependente
8. DMSO: dimetil sulfoxido
9. DTT: ditioneitol
10. ECL: quimiluminescência
11. EDTA: ácido etileno-dinitrilo-tetra-acético
12. ERK: quinase regulada por sinal extracelular
13. GEF: fatores de troca de nucleotídeos da guanina
14. Gly: glicina
15. GMP: monofosfato de guanosina
16. GMPc: monofosfato de guanosina cíclico
17. Grb2: proteína ligante de receptor de fator de crescimento 2
18. GRP78: proteína de 78kDa regulada por glicose
19. GTP: guanosina trifosfato
20. HEPES: ácido N-2-Hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfônico
21. HO-1: heme-oxigenase 1
22. HSF: fator de choque térmico
23. HSP: proteína de choque térmico

24. IP: intra-peritoneal
25. JNK: quinase c-Jun NH₂-terminal
26. LTD: depressão de longa duração
27. LTP: potenciação de longa duração
28. MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno
29. MAPKAPK2: quinase 2 ativada por proteína quinase ativada por mitógeno
30. MAPKK: quinase da proteína quinase ativada por mitógeno
31. MEK: quinase da proteína quinase regulada por sinal extracelular
32. MEKK: quinase da quinase da proteína quinase regulada por sinal extracelular
33. MKK: quinase da proteína quinase ativada por mitógeno
34. MTT: brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium
35. NBT: “nitro blue tetrazolium”
36. NFκB: fator de transcrição nuclear kappa B
37. p38^{MAPK}: proteína quinase ativada por mitógeno de 38 kDa
38. PKC: proteína quinase C
39. PP1: proteína fosfatase 1
40. PP2A: proteína fosfatase 2A
41. Raf: quinase serina/treonina de 74 kDa
42. Ras: proteína G de 21kDa
43. ROS: espécies reativas de oxigênio
44. SAPK: proteína quinase ativada por estresse
45. SDS: dodecil sulfato de sódio
46. SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
47. SNC: sistema nervoso central
48. SOS: “son of sevenless”
49. TBS: tampão tris-salina
50. TBS-T: tampão tris-salina com Tween-20
51. TEMED: N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina
52. Thr: treonina
53. TNFα: fator de necrose tumoral α
54. Tyr: tirosina

RESUMO

VIAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR NO HIPOCAMPO ENVOLVIDAS NA RESPOSTA AO ESTRESSE PRODUZIDA POR CHUMBO E CÁDMIO

Chumbo (Pb) e cádmio (Cd) são metais tóxicos que podem causar danos biológicos. Estes metais podem interagir com uma variedade de moléculas envolvidas na transdução de sinal, incluindo proteínas quinases. O Pb prejudica fenômenos plásticos como LTP e LTD e causa deficiência de aprendizado e memória. A proteína quinase Ca^{2+} /calmodulina-dependente II e classicamente a PKC, tem sido apontadas como alvos do Pb. Recentemente, nós descrevemos em BACC que o chumbo pode ativar p38^{MAPK} e aumentar a fosforilação de Hsp27 via MAPKAPK-2. O Cd possui efeitos carcinogênicos, entretanto, pode ser neurotóxico quando alcança o SNC. O Cd tem sido implicado na modulação das vias das MAPKs e o aumento da expressão de proteínas de choque térmico (HSPs) em uma variedade de linhagens de células. Apesar dessas evidências, os efeitos do Pb e do Cd nas vias das MAPKs e na expressão de HSPs na área hipocampal não está bem investigado. O objetivo geral desse estudo foi determinar a modulação de MAPKs e o conteúdo de proteínas de estresse em fatias hipocampais de ratos imaturos (13-14 dias), em resposta à exposição de Pb e Cd. Fatias foram incubadas (1 e 3h) com Pb (1, 5, 10, 50 e 100 μM) ou com Cd (5, 10, 50, 100 e 200 μM). Alternativamente, os ratos foram tratados *in vivo* (do 8º ao 12º dia pós-natal) com injeções IP de salina (controle) e Pb (2, 8 e 12mg/kg) ou cádmio (0,5, 1 e 3mg/kg). Todos os parâmetros foram analisados em fatias hipocampais preparadas no 14º dia pós-natal. A fosforilação de ERK1/2 e p38^{MAPK} , e os conteúdos de Hsp27 e Hsp70 foram analisados por imunoblotting. A viabilidade celular foi determinada pela análise da redução do MTT. Os resultados mostraram que o Pb *in vitro*, à partir da concentração de 10 μM aumentou a fosforilação de ERK1 e a partir de 5 μM aumentou a fosforilação de p38^{MAPK} no período de 3h de incubação. Nas mesmas condições, todas as concentrações de Cd aumentaram a fosforilação de p38^{MAPK} , entretanto, somente em concentrações mais altas (100-200 μM) o metal aumentou significativamente a fosforilação de ERK1/2. Não foram observados efeitos

na viabilidade celular nos tratamentos com Pb. Por outro lado, nas concentrações mais altas de Cd (100-200 μ M) houve diminuição significativa da viabilidade celular *in vitro*. Nas fatias hipocâmpais de ratos tratados *in vivo*, o Pb causou um aumento da fosforilação de ERK1/2 e p38^{MAPK} em todas as doses testadas. O Cd também aumentou a fosforilação de p38^{MAPK} em todas as doses, mas um aumento da fosforilação de ERK1/2 foi observado somente na dose mais alta (3mg/kg). Além disso, a viabilidade celular avaliada após a exposição de Pb ou Cd *in vivo* não foi modificada. O conteúdo de Hsp27 e Hsp70 não se alterou em resposta aos tratamentos com metais *in vivo* ou *in vitro*. Os resultados mostram que o Pb pode agir no hipocampo nas vias das ERK1/2 e p38^{MAPK}, sugerindo que essa ação pode participar no mecanismo de neurotoxicidade do Pb. Em paralelo, sugerem evidências de que o Cd pode ser um agente neurotóxico, uma vez que ele pode modular as vias de p38^{MAPK} e de ERK no hipocampo.

Financiado por CNPq, FUNPESQUISA – UFSC e CAPES.

ABSTRACT

HIPPOCAMPAL CELLULAR SIGNALLING PATHWAYS INVOLVED IN THE STRESS RESPONSES

PRODUCED BY LEAD AND CADMIUM

Lead (Pb) and cadmium (Cd) are toxic metals that may cause biological damages. These metals may interact with a variety of molecules involved in signal transduction including protein kinases. Pb impairs plastic phenomena such as LTP and LTD and causes learning and memory deficits. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II and classically PKC have been pointed as signalling targets to Pb. Recently, we described, in BACC, that lead may activate p38^{MAPK} and increases the Hsp27 phosphorylation via MAPKAPK-2. Cd has carcinogenic effects, however may be neurotoxic when reaches the CNS. Cd has been implicated in modulation of MAPKs pathways and on the expression of heat shock proteins (HSPs) in a variety of cell lines. In spite of these evidences, the effects of Pb and Cd on MAPK pathways and HSPs expression in hippocampal area are not well investigated. The overall aim of this study was to determine the modulation of MAPKs and the content of stress proteins in hippocampal slices from immature rats (13-14 days old) in response to Pb and Cd exposition. Slices were incubated (1 and 3h) with Pb (1, 5, 10, 50 and 100µM) or Cd (5, 10, 50, 100 and 200µM). Alternatively, rats were treated *in vivo* (from 8th to 12th post-natal day) by i.p. injection of saline (control) or Pb (2, 8 and 12 mg/Kg) or Cd (0.5, 1 and 3 mg/Kg). All parameters were analyzed in hippocampal slices prepared on 14th post-natal day. The phosphorylation of ERK1/2 and P38^{MAPK}, and the content of Hsp27 and Hsp70 were analyzed by immunoblotting. Cellular viability was determined by analysis of MTT reduction. The results showed that Pb *in vitro* from concentration of 10µM increased the phosphorylation of ERK1 and from 5µM increased the phosphorylation of p38^{MAPK} at 3h incubation period. In the same conditions, all concentrations of Cd increased p38^{MAPK} phosphorylation, however, only the higher concentrations (100-200µM) increased significantly the ERK1/2 phosphorylation. No effect of lead treatment on cell viability was observed. On the other hand, cadmium at higher concentrations (100-200µM) decreased significantly the cell

viability *in vitro*. In hippocampal slices from rats treated *in vivo*, Pb caused an increase of ERK1/2 and p38^{MAPK} phosphorylation in all doses tested. Cd also increased p38^{MAPK} phosphorylation in all doses, but an increase on ERK1/2 phosphorylation was found only at the higher dose (3mg/Kg). Moreover, the cellular viability measured after exposition to Pb or Cd *in vivo* was not modified. The content of Hsp27 and 70 was not changed by either *in vivo* or *in vitro* treatments with the metals. The overall results show that Pb may act in the hippocampus on the ERK1/2 and p38^{MAPK} pathways, suggesting that this action may be responsible, at least in part, for lead neurotoxicity. In parallel, the results provide that cadmium may be a neurotoxic agent since it can modulate p38^{MAPK} and ERK pathways in the hippocampus.

Supported by CNPq, FUNPESQUISA-UFSC and CAPES

1-INTRODUÇÃO

1.1-METAIS PESADOS

Muitos metais pesados são conhecidos como essenciais para a vida como, por exemplo, ferro, níquel, cobre, magnésio, zinco, cromo, manganês, molibdênio, cobalto e vanádio. Entretanto, alguns metais são tóxicos para as células podendo causar danos biológicos irreversíveis aos seres vivos (ROSSI *et al.*, 1991; DEMOOR & KOROPATNICK, 2000). Entre os metais, chumbo e cádmio mostram importantes ações citotóxicas (DEMOOR & KOROPATNICK, 2000). Evidências sugerem que estes metais são captados por células nervosas através de canais de cálcio (USAI *et al.*, 1999; MAZZOLINI *et al.*, 2001). As principais fontes de contaminação ambiental destes metais são dejetos de indústrias metalúrgicas e mineradoras, fertilizantes fosfatados, baterias automotivas, gasolina, tintas, alimentos contaminados pela deposição dos metais ao solo e água e inalação através de cigarro (PORTO, 1989; ELINDER, 1991; OKADA *et al.*, 1997; JARUP *et al.*, 1998; BRESSLER *et al.*, 1999; FALNOGA, *et al.*, 2000; RYAN *et al.*, 2000; ABU-HAYYEH, *et al.*, 2001; ALONSO *et al.*, 2001; ISHIHARA *et al.*, 2001; LINDEN *et al.*, 2001). Nesse sentido, um dos principais problemas da contaminação ambiental por metais tóxicos é a sua

participação na cadeia alimentar (LINDEN *et al.*, 2001; BLANUSA & JURESA, 2001; ISHIHARA *et al.*, 2001; STORELLI & MARCOTRIGIANO, 2001).

O chumbo é um metal primariamente neurotóxico que prejudica fenômenos plásticos do sistema nervoso central (SNC), como a potenciação de longa duração (LTP) e a depressão de longa duração (LTD) (GILBERT *et al.*, 1999; ZHAO *et al.*, 1999). Foi bem documentado que este metal causa deficiência de aprendizado e memória (BRESSLER *et al.*, 1999; GILBERT *et al.*, 1999) especialmente em crianças (FINKELSTEIN *et al.*, 1998). Além disso, o chumbo também pode prejudicar funções motoras e sensoriais (RODRIGUES *et al.*, 1996; MAMELI *et al.*, 2001). Adicionalmente, o chumbo pode prejudicar a atividade mitocondrial em preparações neurais, provocando redução na produção de ATP, diminuição na atividade da Na⁺-K⁺-ATPase e diminuição da viabilidade celular (GMEREK *et al.*, 1981; WALTON, 1982; DUMAS *et al.*, 1985; STRUZYNSKA *et al.*, 1997). O cádmio é mais conhecido por possuir efeitos mutagênicos, carcinogênicos e teratogênicos (GEBHART & ROSSMAN, 1991; WAALKES, 2000). Estes efeitos na indução de genotoxicidade e carcinogenicidade provavelmente ocorrem por interações indiretas, como o estresse oxidativo (VALVERDE *et al.*, 2001) e alterações em moléculas de adesão como a E-caderina (PEARSON & PROZIALECK, 2001). Por outro lado, o cádmio também pode causar neurotoxicidade quando atinge o SNC, sendo este efeito sugerido inicialmente como uma reação secundária aos seus efeitos nos vasos sanguíneos cerebrais com hemorragia, edema intersticial e anóxia (GABBIANI *et al.*, 1974; WEBSTER & VALOIS, 1981; NOLAN & SHAIKH, 1986). Entretanto, estudos recentes demonstram que o cádmio pode ter efeito direto nos neurônios (YOSHIDA, 2001). Além disso, este metal também afeta sistemas de neurotransmissão (HERBA *et al.*, 2000; MINAMI *et al.*, 2001) e causa citotoxicidade com indução de proteínas de choque térmico (HSPs), geração de radicais livres, redução dos níveis de glutatona e

morte celular em oligodendrócitos (ALMAZAN *et al.*, 2000). Adicionalmente, o cádmio também pode diminuir a viabilidade das células, prejudicando o metabolismo mitocondrial (AL-NASSER, 2000).

Dessa maneira, os metais possuem diversos alvos moleculares nos sistemas biológicos e essa interação pode resultar na modificação de várias vias de sinalização intracelular (DEMOOR & KOROPATNICK, 2000; MATSUOKA *et al.*, 2000), porém ainda se sabe muito pouco sobre os mecanismos moleculares da intoxicação por metais pesados.

1.2-SINALIZAÇÃO CELULAR

A sinalização celular é um evento onde um ligante externo (por exemplo, um neurotransmissor) é capaz de produzir uma resposta específica da célula. As células respondem a sinais extracelulares através de vários mecanismos, pela transdução de sinais iniciados pela interação de ligantes extracelulares (hormônios, citocinas, neurotransmissores, fatores de crescimento e outras moléculas de sinalização) com receptores específicos ancorados principalmente na membrana plasmática, ou também no citoplasma ou no núcleo. Os sinais são transduzidos da superfície celular para o interior da célula através da interação proteína-proteína ou pela geração de segundos mensageiros como o cálcio, diacilglicerol, inositol 1,4,5-trifosfato, AMP cíclico e GMP cíclico, que levam à ativação de proteínas quinases específicas. O resultado final da ativação de uma via de sinalização é a fosforilação de proteínas alvo específicas, modulando a sua atividade e a atividade da própria célula (HOLZ & FISHER, 1999).

1.2.1-Fosforilação de Proteínas

A fosforilação de proteínas realiza um papel fundamental na regulação de diversas funções celulares, sendo o principal mecanismo acionado no processo de transdução de sinal, em resposta a diversos sinais extracelulares (HUNTER, 1995; PAWSON & SCOTT, 1997; LAU & HUGANIR, 1999; NESTLER & GREENGARD, 1999; SCHILLACE & SCOTT, 1999).

Um sistema de fosforilação consiste de uma proteína quinase, uma proteína fosfatase e uma proteína aceptora de fosfato (proteína substrato). A proteína substrato é convertida da forma defosforilada para a forma fosforilada pela proteína quinase, e o retorno para a forma defosforilada é realizado pela proteína fosfatase (Fig. 1).

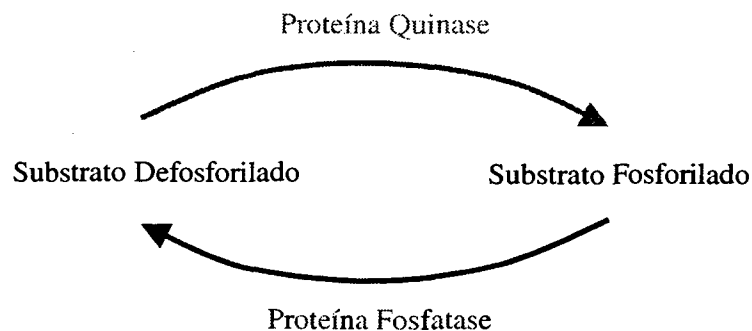


Figura 01-Diagrama esquemático do sistema de fosforilação de proteínas.

As proteínas quinases catalisam a transferência de um grupo fosfato (γ) do ATP para um resíduo de serina, treonina ou tirosina da proteína substrato. As proteínas fosfatases catalisam a clivagem dessa ligação por hidrólise. A fosforilação de uma proteína altera sua carga e por consequência sua conformação. Esse mecanismo regula a atividade funcional de

diversas proteínas levando a respostas biológicas específicas. Dessa forma, a fosforilação/defosforilação de proteínas pode regular a atividade catalítica de enzimas, abertura/fechamento de canais iônicos, atividade de receptores, atividade de fatores de transcrição, localização subcelular de proteínas, dinâmica do citoesqueleto, etc (GREENGARD, 2001).

Proteínas quinases diferem na sua distribuição celular e subcelular, especificidade de substrato e regulação por mensageiros celulares. Entre as principais quinases do cérebro estão aquelas ativadas por: AMPc (proteína quinase A), GMPc (proteína quinase G), cálcio/calmodulina (proteínas quinases Ca^{2+} -calmodulina dependente) e por cálcio-diacilglicerol (proteína quinase C) (NESTLER & GREENGARD, 1984; HUNTER & SEFTON, 1991; NESTLER & GREENGARD, 1999). Adicionalmente, é bem documentada no SNC a cascata de sinalização das proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs) (SWEATT, 2001).

1.2.2-MAPK

MAPKs são uma família de serina/treonina quinases que medeiam a transdução de sinal intracelular em resposta a diferentes estímulos (ROBINSON & COBB, 1997). As três principais MAPKs identificadas são as quinases reguladas por sinal extracelular (ERK1/2) e as proteínas quinases ativadas por estresse, as quinases c-Jun NH₂-terminal (JNK, SAPK1) e as p38^{MAPK} (SAPK2) (Fig. 2).

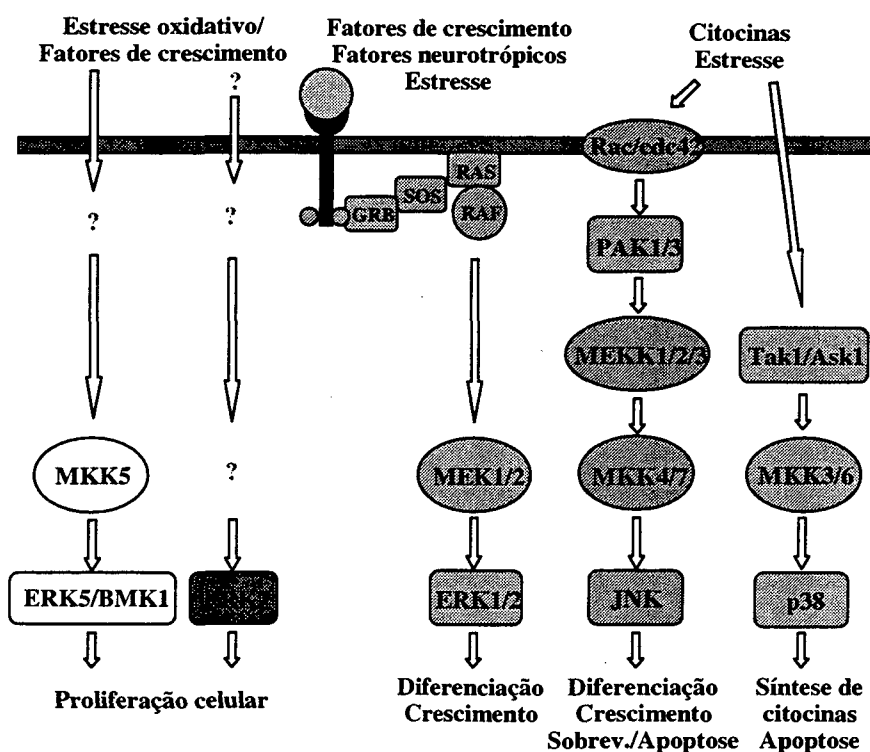


Figura 02-Cascata de sinalização das MAPKs.

A cascata das ERK1/2 está presente em todos os eucariontes e é amplamente utilizada na regulação celular (ROBINSON & COBB, 1997; CHANG & KARIN, 2001). As ERK1/2 são primariamente ativadas por fatores de crescimento (SEGER & KREBS, 1995), mas

podem ser ativadas por diversos estímulos como citocinas, choque térmico, luz ultravioleta, isquemia, estresse oxidativo e metais pesados (HUNG *et al.*, 1998a; BHAT & ZHANG, 1999; RAMESH *et al.*, 1999; IRVING *et al.*, 2000; NG & BOGOYEVITCH, 2000; GU *et al.*, 2001). O mecanismo mais conhecido de ativação de ERK é através de receptores tirosina quinase. Nesses receptores, os ligantes, como os fatores de crescimento neural e epidermal, causam autofosforilação do receptor (em resíduos de tirosina) que então se liga à proteínas adaptadoras, como a Grb2 (proteína ligante de receptor de fator de crescimento 2). A Grb2 é uma molécula adaptadora que possui um domínio SH2 e dois domínios SH3. O domínio SH2 reconhece a tirosina fosforilada em certos receptores tirosina quinase, como o receptor de fator de crescimento epidermal, e ancora a Grb2 à essas proteínas. Os domínios SH3 interagem com SOS (“son of sevenless”), uma proteína trocadora de nucleotídeos da guanina. SOS estimula a liberação de GDP e subsequente ligação de GTP à Ras (proteína G de 21 kDa). Ras ligada ao GTP interage com Raf (quinase serina/treonina de 74 kDa) e a transloca para a membrana plasmática, onde se torna ativa. As Raf ativadas fosforilam as MAPKKs (quinases que ativam as MAPKs, também conhecidas como MEKs) que por sua vez, ativam as ERKs (Fig. 2) (COBB & GOLDSMITH, 1995; WILSBACHER *et al.*, 1999). Adicionalmente, a via das MAPKs também pode ser regulada pela PKC, que pode ativar diretamente a Raf-1 por fosforilação (KOLCH *et al.*, 1993). As MEKs são vistas como quinases bastante específicas, que fosforilam somente ERKs. Assim, a marcada especificidade das MEKs contribui para a seletividade de ativação de suas quinases alvo (COBB & GOLDSMITH, 1995). A ativação de ERK depende da fosforilação nos resíduos treonina 183 e tirosina 185, sendo que a defosforilação de qualquer sítio por uma fosfatase inativa a enzima (COBB & GOLDSMITH, 1995).

As ERK1/2 possuem uma variedade de substratos e exercem diversas funções. Nos mamíferos, essas vias de sinalização regulam importantes processos celulares que incluem: expressão de genes, proliferação, sobrevivência/morte e reorganização do citoesqueleto (ROBINSON & COBB, 1997; YU *et al.*, 2000; CHANG & KARIN, 2001). Além disso, outra importante função atribuída a estas enzimas no SNC é a participação nos processos de aprendizado e na formação de memória dependente do hipocampo (KORNHAUSER & GREENBERG, 1997; BLUM *et al.*, 1999; ORBAN *et al.*, 1999; SWEATT, 2001). Adicionalmente, participam dos processos de indução de LTP (LIU *et al.*, 1999; ORBAN *et al.*, 1999; DAVIS *et al.*, 2000; SWEATT, 2001) e LTD (KAWASAKI *et al.*, 1999), fenômenos considerados como modelos de plasticidade sináptica. Estudos demonstram que metais neurotóxicos como o chumbo, prejudicam estes fenômenos (GILBERT *et al.*, 1999; ZHAO *et al.*, 1999), além de causar deficiência de aprendizado e memória (BRESSLER *et al.*, 1999; GILBERT *et al.*, 1999).

JNK e p38^{MAPK} são ativadas por insultos citotóxicos e estão associadas freqüentemente com apoptose (RAINGEAUD *et al.*, 1995; SEIMIYA *et al.*, 1997). As JNKs são ativadas por fosforilação nos seus resíduos de treonina e tirosina nas posições 183 e 185 na JNK1 e na JNK2, e nas posições 221 e 223 na JNK3 (MIELKE & HERDEGEN, 2000). As JNKs são largamente distribuídas nos tecidos dos mamíferos, incluindo o cérebro. Atualmente se conhece pouco sobre a função e ativação das JNKs em condições fisiológicas. Entretanto, a expressão e atividade das proteínas JNK e JNKK (enzima que ativa a JNK), em condições basais ou por estímulos ambientais não nocivos, fornece sustentação para papéis fisiológicos das JNKs no SNC (CARBONI *et al.*, 1997; XU *et al.*, 1997; YANG *et al.*, 1997; HERDEGEN *et al.*, 1998; MIELKE *et al.*, 2000). Um possível papel das JNKs é o envolvimento na regeneração neuronal e neuroplasticidade (MIELKE & HERDEGEN, 2000).

Além disso, também são sugeridos como potenciais papéis fisiológicos das JNKs seus efeitos anti-apoptóticos (KUAN *et al.*, 1999; WISDOM *et al.*, 1999). Apesar de vários estudos sugerirem possíveis papéis fisiológicos para as JNKs, é bem caracterizada a participação dessas quinases como mediadores de morte celular neuronal e degeneração na excitotoxicidade, isquemia, lesões de fibras nervosas, retirada de fatores tróficos e na toxicidade por metais pesados (IRYO *et al.*, 2000; MIELKE & HERDEGEN, 2000). A natureza dupla dessas respostas (morte celular ou regeneração) não é completamente entendida. Entretanto, a ativação das cascatas de transdução de sinal intracelular, protetoras ou degenerativas, ocorre de uma forma paralela ou em ramificação e é determinada pela viabilidade de moléculas tróficas, estimulação transmembrana ou parâmetros físico-químicos que alteram o balanço dos programas anti- ou pró-degenerativos (MIELKE & HERDEGEN, 2000).

Juntamente com as ERKs e as JNKs, as $p38^{\text{MAPK}}$ formam a terceira família das MAPKs. Essas enzimas foram primeiro identificadas em 1994, como MAPKs alvo para endotoxinas e hiperosmolaridade em células de mamíferos (HAN *et al.*, 1994). Subseqüentemente, várias formas de estresse celular foram caracterizadas como ativadoras de $p38^{\text{MAPK}}$ em mamíferos (KYRIAKIS & AVRUCH, 1996). As $p38^{\text{MAPK}}$ representam uma família de quatro quinases homólogas: $p38\alpha$, $p38\beta$, $p38\gamma$ e $p38\delta$, que derivam de diferentes genes, e são ativadas por fosforilação dupla nos resíduos de treonina 180 e tirosina 182 dentro do sítio Thr-Gly-Tyr. As quatro isoformas possuem um tamanho similar (de 360 a 372 aminoácidos) e de 60 a 75% de homologia entre elas e 48% de homologia com a ERK (MARTIN-BLANCO, 2000). Assim como as JNKs, as $p38^{\text{MAPK}}$ são largamente expressas em muitos tecidos, além do SNC. A alta atividade basal no SNC está em contradição à hipótese de que a $p38^{\text{MAPK}}$ age como uma quinase ativada por estresse envolvida na apoptose, mas

muito pouco se sabe até o momento sobre a função e ativação da enzima em condições fisiológicas (MIELKE & HERDEGEN, 2000). Estudos sugerem que essa enzima possui importante papel na regulação da resposta imune, proliferação e diferenciação celular (TAKENAKA *et al.*, 1998; MIELKE *et al.*, 1999; MARTÍN-BLANCO, 2000). Adicionalmente, MIELKE & HERDEGEN (2000) sugerem que a estabilização da diferenciação pós-mitótica dos neurônios é um provável papel fisiológico da p38^{MAPK}. Adicionalmente, trabalhos sugerem funções neuroprotetoras exercidas pela p38^{MAPK} (UEHARA *et al.*, 1999; HENSLEY *et al.*, 2000). Entretanto, é bem caracterizado o envolvimento dessa enzima em condições de estresse e morte celular, como isquemia (IRVING *et al.*, 2000), estresse oxidativo (CLERK *et al.*, 1998; LEE & CORRY, 1998; BHAT & ZHANG, 1999; LEE *et al.*, 2000), excitotoxicidade (KAWASAKI *et al.*, 1997) e intoxicações por metais pesados (HUNG *et al.*, 1998a; SAMET *et al.*, 1998; WANG & BONNER, 2000; IRYO *et al.*, 2000).

1.3-METAIS E SINALIZAÇÃO CELULAR

Os metais podem modificar a sinalização celular por diversos mecanismos (DEMOOR & KOROPATNICK, 2000). O chumbo pode afetar o mecanismo de liberação de neurotransmissores (BRESSLER *et al.*, 1996), a atividade de canais de cálcio (KISS & OSIPENKO, 1994), a atividade de enzimas como adenilato ciclase (SANDHIR & GILL, 1994; RODRIGUES *et al.*, 1999) e pode mimetizar a ação do cálcio e causar ativação de proteínas cálcio-moduladas (BRESSLER *et al.*, 1999). A proteína quinase C (PKC) é classicamente apontada como um alvo importante para o chumbo (MARKOVAC & GOLDSTEIN, 1988; MURAKAMI *et al.*, 1993; RAJANNA *et al.*, 1995; SUN *et al.*, 1999).

Além disso, a proteína quinase Ca^{2+} /calmodulina dependente (CaMK) pode representar um alvo potencial para a ação do chumbo e do cádmio via calmodulina (VIG & NATH, 1991; KERN & AUDESIRK, 1995; KERN *et al.*, 2000). Recentemente, também foi descrito que o chumbo pode estimular a atividade e fosforilação de ERK e JNK em células PC12 e modificar a expressão de fatores de transcrição como NF- κ B e AP-1 (RAMESH *et al.*, 1999). O cádmio também tem efeito sobre os sistemas de transdução de sinal, causando ativação de enzimas das vias de sinalização celular, como as MAPKs. Em linhagens de células tumorais o cádmio pode ocasionar ativação de ERK1/2 e p38^{MAPK} , causando mitogênese e apoptose, respectivamente (HUNG *et al.*, 1998a). De modo semelhante, em promonócitos o cádmio provoca ativação de p38^{MAPK} e apoptose (GALÁN, *et al.*, 2000). A ativação de p38^{MAPK} e ERK1/2 também foi observada em resposta à exposição a outros metais (As, Cr, V, Zn) em células do trato respiratório (SAMET *et al.*, 1998; WANG & BONNER, 2000), sendo estas ações associadas a respostas inflamatórias. Além destas ações, o chumbo e o cádmio podem produzir estresse oxidativo em diversos modelos celulares (SANDHIR *et al.*, 1994; ACAN & TEZCAN, 1995; STOHS & BAGCHI, 1995; FIGUEIREDO-PEREIRA *et al.*, 1998; STOHS *et al.*, 2001), sendo este um mecanismo que pode modificar a sinalização e também levar à morte celular.

1.4-RESPOSTAS DE ESTRESSE

Em tecidos e células neuronais ou não neuronais, a chamada resposta de estresse compreende alterações enzimáticas e genéticas mais ou menos bem definidas após o estímulo de estresse. Esses fatores de estresse podem ser privação de fatores tróficos, radiação ionizante, choque térmico, radicais livres (H_2O_2 e peroxinitrito), luz ultravioleta, choque

osmótico, lipopolissacarídeo bacteriano, hipóxia, isquemia e metais pesados. Esses estímulos potencialmente deletérios provocam reações intracelulares que levam à morte celular ou a adaptações defensivas (MIELKE & HERDEGEN, 2000).

Existem evidências de que os neurônios respondem ao estresse com ativação de cascatas de transdução de sinal e expressão de genes. Essas reações compreendem, entre outras, a expressão e liberação de interleucinas e $\text{TNF}\alpha$ e seus respectivos receptores (BRUCE *et al.*, 1996), ativação de proteases (NICHOLSON & THORNBERRY, 1997) e ativação das quinases de estresse JNK e p38^{MAPK} (XIA *et al.*, 1995; HERDEGEN *et al.*, 1998; MIELKE *et al.*, 1999). Além disso, um dos importantes eventos é o aumento da expressão de proteínas de choque térmico ("heat shock proteins"; HSPs), também chamadas proteínas de estresse (OHTSUKA & SUZUKI, 2000). Este tipo de resposta depende da ativação de fatores ("heat shock factors"; HSFs) que estimulam a transcrição de HSPs (SHARP *et al.*, 1999). A ativação de HSF1, por exemplo, envolve sua fosforilação por p38^{MAPK} e/ou ERK1/2 (HUNG *et al.*, 1998a e 1998b). Adicionalmente, a Hsp27 pode ser regulada diretamente por fosforilação dependente da ativação da cascata da p38^{MAPK} (STOKOE *et al.*, 1992; MIELKE & HERDEGEN, 2000). HSPs servem como chaperones que ligam outras proteínas regulando sua conformação, movimento através de membrana ou organelas, disponibilidade de receptores ou atividade de enzimas. Desta forma, as HSPs exercem em geral um efeito protetor nas células (ROGALLA *et al.*, 1999; SHARP *et al.*, 1999). Evidências sugerem que algumas HSPs podem regular negativamente o programa apoptótico, exercendo este efeito de maneira similar à proteína anti-apoptótica Bcl-2, modulando a liberação de citocromo *c* ou o estado redox da célula (SAMALI & ORRENIUS, 1998). Alguns exemplos da família das HSPs são: ubiquitina, Hsp110, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp47, Hsp32, Hsp27, HO-1 e GRP78.

1.5-MÉTODOS DE ESTUDO PARA ABORDAGENS NEUROQUÍMICAS

O uso de sistemas experimentais *in vitro* permite a avaliação de mudanças bioquímicas com relativa facilidade e permitem um controle sobre a complexidade química e celular do sistema nervoso. Nesse sentido, as técnicas de culturas celulares oferecem importantes meios de estudo do SNC. Diversos tipos celulares são utilizados, desde culturas puras de astrócitos ou neurônios até linhagens de células tumorais, como por exemplo, C6 glioma e neuroblastoma. As vantagens do uso das culturas estão na possibilidade do controle físico-químico do ambiente, abolem o efeito da barreira hematoencefálica removendo agentes de sinalização endógenos e permitem o estudo de uma determinada área isolada dos mecanismos homeostáticos normais *in vivo* (VERONESI & EHRICH, 1999).

Outro modelo de estudo em neuroquímica está baseado no uso de estruturas intactas como, por exemplo, fatias cerebrais. A importância deste modelo está na conservação da integridade do tecido. Em fatias é possível manter os neurônios no ambiente fisiológico do cérebro, consistindo de matriz extracelular natural, conectividade neuronal e interações neurônio-glia, além disso, os perfis das proteínas fosfatase e quinase permanecem praticamente os mesmos em relação ao cérebro (RODNIGHT *et al.*, 1988; GONG *et al.*, 2001). Dessa maneira, fatias cerebrais constituem um modelo adequado para estudo de substâncias que possam modificar o funcionamento bioquímico do SNC.

Os modelos *in vivo*, são de fundamental importância para validar os modelos de estudo *in vitro* do sistema nervoso central. Uma grande vantagem deste tipo de abordagem é que permite a avaliação de diversos parâmetros em conjunto, como por exemplo: aspectos comportamentais, aspectos bioquímicos, morfológicos e fisiopatológicos das células, e estas abordagens podem ainda ser correlacionadas com diferentes estágios de desenvolvimento e

com estruturas cerebrais específicas. No caso de substâncias neurotóxicas é essencial que as avaliações *in vitro* relacionadas, por exemplo, à alterações celulares e bioquímicas, sejam também realizadas em modelos animais expostos *in vivo*.

O hipocampo merece atenção especial nos estudos sobre os efeitos tóxicos de metais pesados. O chumbo afeta a morfologia e a plasticidade cognitiva no hipocampo onde as células granulares parecem ser particularmente susceptíveis à toxicidade do metal, especialmente durante o período de desenvolvimento rápido pós-natal (STOLTENBURG-DIDINGER, 1994).

Existem atualmente, várias metodologias que permitem o acesso às modificações bioquímicas que ocorrem nas células nos vários modelos experimentais utilizados. Uma importante técnica nos estudos de fosforilação é a eletroforese unidimensional ou bidimensional para separação de proteínas (RODNIGHT *et al.*, 1988; SILVA JÚNIOR, 2001). A detecção e caracterização das fosfoproteínas podem ser feitas através de amostras pré-marcadas com ^{32}Pi (RODNIGHT & LEAL, 1990) ou alternativamente, através de Imunoblotting. Essa técnica, também denominada de “Western Blotting”, permite a transferência das proteínas (separadas por eletroforese) para a nitrocelulose seguida da detecção específica através do uso de anticorpos (BALDO, 1994; BOBROVSKAYA *et al.*, 2001; NAGATA *et al.*, 2001). Atualmente existem diversos tipos de anticorpos dirigidos contra os sítios fosforilados das fosfoproteínas, permitindo desta forma a medição da fosforilação sobre sítios específicos das proteínas de interesse. Esse tipo de metodologia abole em grande parte a necessidade de utilização de amostras marcadas com isótopos radioativos (NAGATA *et al.*, 2001).

1.6-JUSTIFICATIVA

Como pode ser verificado, tem sido demonstrada a capacidade que os metais pesados possuem para afetar o comportamento da célula iniciando ou influenciando as vias de transdução de sinal, modificando a atividade das proteínas quinases e o estado de fosforilação de proteínas (O'CALLAGHAN, 1994; BELLONI-OLIVI *et al.*, 1996; SAMET *et al.*, 1998; GALÀN, *et al.*, 2000; DEMOOR & KOROPATNICK, 2000). Adicionalmente, são bem documentados os efeitos moleculares dos metais em vários modelos experimentais (principalmente culturas celulares) (HUNG *et al.*, 1998; RAMESH *et al.*, 1999; WILLIAMS *et al.*, 2000). Tem sido mostrada a modulação de ERK e JNK pelo chumbo em culturas de células PC12 (RAMESH, *et al.*, 1999; WILLIAMS *et al.*, 2000). Além disso, em linhagens de células tumorais cerebrais o cádmio pode ocasionar a ativação de ERK1/2 e p38^{MAPK} (HUNG *et al.*, 1998a). Recentemente, nós demonstramos o efeito do chumbo na via das MAPKs, com ativação de p38^{MAPK}, seguida da estimulação da proteína quinase ativada por MAPK (MAPKAPK2; substrato da p38^{MAPK}), resultando em fosforilação massiva de Hsp27 (LEAL *et al.*, 2002). Além disso metais pesados podem induzir a expressão de alguns tipos de HSPs. Estudos demonstram aumentos na fosforilação de Hsp27 via p38^{MAPK} pelo cádmio e aumento da expressão de HSPs pelo chumbo em vários modelos de culturas de células (MILLER & QURESHI, 1992; OPANASHUK & FINKELSTEIN, 1995b; HUNG *et al.*, 1998a e 1998b; QIAN *et al.*, 2000).

Entretanto, não há dados que mostram a modulação de MAPKs e a indução da expressão de HSPs por metais pesados no SNC.

2-OBJETIVOS

2.1-OBJETIVO GERAL

Investigar a ação de metais pesados sobre a modulação da fosforilação de proteínas no hipocampo, com ênfase nas vias de sinalização das MAPKs.

2.2-OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1-Padronização da metodologia de “Western Blotting”

2.2.2-Efeitos do chumbo e cádmio *in vitro*

- Determinação da ação do chumbo e do cádmio sobre a viabilidade celular em fatias hipocámpais de ratos jovens e adultos e frações sinaptossomais de ratos adultos;
- Caracterização da modulação da fosforilação das quinases p38^{MAPK} e ERK1/2 pelos metais, bem como o papel de p38^{MAPK} na viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos jovens;

- Determinação do envolvimento das HSPs nas respostas à exposição aos metais. Avaliação quantitativa de Hsp27 e Hsp70 em fatias hipocâmpais de ratos jovens.

2.2.3-Efeitos do chumbo e cádmio *in vivo*

- Avaliação da viabilidade celular em fatias hipocâmpais de animais jovens expostos ao chumbo e cádmio e paralelamente, avaliação de ganho de peso corporal;
- Determinação da modificação do estado de fosforilação de p38^{MAPK} e ERK1/2 no hipocampo de ratos jovens;
- Determinação do conteúdo de proteínas pela exposição *in vivo* de animais jovens aos metais: primariamente o imunoconteúdo de HSPs e proteínas quinases p38^{MAPK} e ERK1/2, secundariamente das subunidades catalíticas das proteínas fosfatases 1 e 2A.

3-MATERIAIS E MÉTODOS

3.1-ANIMAIS

Nos modelos experimentais foram utilizados ratos da linhagem Wistar provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Foram usados ratos adultos com idade entre 60 e 70 dias, ratos jovens com idade entre 13 e 15 dias e ninhadas contendo oito animais, recebidos no 5º dia pós-natal e mantidos até o 14º dia pós-natal. Os animais receberam água e comida *ad libitum*, foram mantidos em ambiente com ciclo claro-escuro de 12 horas e temperatura entre 22 e 25°C, sendo manipulados e mortos de acordo com o código de ética de utilização de animais para pesquisa, conforme protocolo aprovado pela CEUA (número 062/CEUA-23080.001057/2001-78).

3.2-MATERIAS

β -mercaptoetanol, Ácido Bórico, Coomassie Blue R-250, DTT, kit ECL, Glicina, Nitrocelulose, Persulfato de Amônia, SDS, TEMED, Tris e anticorpos secundários (mouse e rabbit) conjugados à peroxidase foram obtidos da Amersham Pharmacia Biotech®.

Ácido Acético, Cloreto de Cádmio, Cloreto de Cálcio, Cloreto de Potássio, Cloreto de Sódio, Glicerol, Hidróxido de Sódio, Metanol, Sulfato de Magnésio foram obtidos da MERCK®.

Acrilamida, Acetato de Chumbo, Anticorpo anti-fosfo-ERK mouse, Anticorpo secundário anti-rabbit conjugado à fosfatase alcalina, Bis-acrilamida, Bromofenol Blue, Dimetil Formamida, EDTA, FOLIN, Glicose, HEPES, MTT, Sacarose, Soro Albumina Bovina foram obtidos da SIGMA®.

Os anticorpos anti-ERK rabbit, anti-fosfo-p38^{MAPK} rabbit, anti-Hsp27 rabbit, anti-Hsp70 rabbit, anti-p38^{MAPK} rabbit e os anticorpos secundários anti-mouse ou anti-rabbit conjugados à fosfatase alcalina ou à peroxidase foram obtidos da CALBIOCHEM®.

Padrão de Peso Molecular, BCIP e NBT foram obtidos da BIO-RAD®. PMSF, Ponceau e Tween 20 foram obtidos da USB®. As soluções Fixadora e Reveladora foram obtidas da KODAK®. Papel Filtro 3MM foi obtido da Whatman® e os Anticorpos anti-PP1 rabbit e anti-PP2A rabbit foram gentilmente cedidos pelo Dr. Alistair Sim.

3.3-EQUIPAMENTOS

- Agitador Orbital BIOMIXER® modelo MOS-1
- Aparato de Gel Gradiente BIO-RAD®
- Balança Analítica SCIENTECH® modelo SA 120
- Banho Maria FANEM® modelo 102
- Centrífuga Refrigerada HITACHI® modelo Himac CR20B2
- Cuba de Eletrotransferência HOEFER® modelo TE 22
- Espectrofotômetro MICRONAL® modelo B 382

- Fatiador de tecidos de McILWAIN®
- Fonte para Eletroforese Amersham Pharmacia Biotech® modelo EPS 301
- Leitor de Elisa WHITTAKER® modelo 2001
- pHmetro DIGIMED® modelo DM 20
- Vortex FANEM®

3.4-PREPARAÇÃO DE FATIAS HIPOCAMPAS

Os animais foram mortos por decapitação utilizando guilhotina e os cérebros retirados a 4°C sobre uma placa de Petri invertida, recoberta com papel filtro umedecido com tampão HEPES-salina (124mM de NaCl, 4mM de KCl, 1,2mM de MgSO₄, 25mM de HEPES, 12mM de glicose e 1mM de CaCl₂, pH 7.4) previamente oxigenado por 30 minutos. Os hipocampus foram dissecados com o auxílio de pincéis finos e macios e fatiados na espessura de 400µm, utilizando um fatiador de tecidos de McIlwain. Após este procedimento, os hipocampus foram mantidos submersos em tampão HEPES-salina refrigerado dentro de um recipiente de fundo escuro. Isto permitia uma melhor visualização da estrutura, facilitando a realização da separação das fatias com pincéis. As fatias selecionadas foram então submetidas aos diversos tratamentos. Cada animal (2 hipocampus) fornecia aproximadamente 12 fatias adequadas para os experimentos.

3.5-PREPARAÇÃO DE FRAÇÃO SINAPTOSSOMAL

Para preparação de sinaptossomas foram utilizados ratos adultos mortos por decapitação com guilhotina. Depois de retirado o cérebro, o córtex e o hipocampo foram

dissecados com pincéis em meio refrigerado e homogeneizados separadamente em solução de sacarose 0,32M contendo 1mM de EDTA e 25mM de DTT numa relação peso/volume de 1/10, utilizando homogenizadores de vidro (DUNKLEY *et al.*, 1986; PHELAN & GORDON-WEEKS, 1997). Após esse procedimento, os homogenatos foram submetidos a uma primeira centrifugação de 10 minutos a 1.000xg em centrífuga refrigerada (4°C) Hitachi®. O sobrenadante (S1) foi coletado com o auxílio de pipetas Pasteur e submetido a uma segunda centrifugação a 10.000xg por 20 minutos a 4°C. Após a segunda centrifugação, o sobrenadante (S2) foi descartado e o pellet (P2) foi resuspenso em 3ml de tampão HEPES-salina (correspondente à fração sinaptossomal crua) e mantido sob refrigeração. Alíquotas contendo 100µg de proteína foram separadas em microtubos para serem submetidas aos tratamentos.

3.6-EXPOSIÇÃO AO CHUMBO E CÁDMIO *IN VITRO*

As fatias de hipocampo, previamente selecionadas, foram pré-incubadas em placas de poliestireno de 96 poços (para avaliação da viabilidade celular) ou em microtubos (para “Western Blotting¹”) em 200µl de meio HEPES-salina por 30 minutos em temperatura ambiente, para permitir a recuperação metabólica do tecido. Após esse período, o meio foi retirado e as fatias submetidas a incubações por períodos de 1 ou 3 horas a 37°C, com meio de incubação (tampão HEPES-salina) contendo chumbo em concentrações de 1, 5, 10, 50 e 100µM ou cádmio em concentrações de 5, 10, 50, 100 e 200µM. Para controle fatias foram incubadas com tampão HEPES-salina. Nas incubações de 3 horas, o meio foi renovado a cada hora para garantir o suprimento de oxigênio e glicose. Para realização de um estudo

¹ Nome em inglês da técnica utilizada para eletrotransferência de proteínas.

comparativo de viabilidade celular, frações sinaptossomais de córtex e hipocampo (com conteúdo protéico similar ao das fatias; 100µg) também foram expostas ao chumbo nas mesmas concentrações, porém em tempos de 20, 40 e 60 minutos.

3.7-EXPOSIÇÃO AO CHUMBO E CÁDMIO *IN VIVO*

Para a realização dos experimentos *in vivo*, foram utilizadas ninhadas de oito animais (divididos em 4 grupos). Os grupos foram tratados via intra-peritoneal (IP) com salina (NaCl a 0,9%; grupo controle) e chumbo em doses de 2, 8 e 12mg/kg ou com salina e cádmio em doses de 0,5, 1 e 3mg/kg. Os tratamentos eram feitos durante 5 dias consecutivos, no período entre os dias 8 e 12 pós-natal. As doses utilizadas foram baseadas em estudos prévios nos quais os ratos foram expostos a doses de chumbo entre 3,5 e 8mg/kg (ROCHA *et al.*, 1995; GOULART *et al.*, 2001). Os animais foram mortos no 14º dia de idade (48 horas após o último tratamento) e as fatias hipocampais foram preparadas, como descrito acima, para avaliação da viabilidade celular e análise de proteínas.

3.8-AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MITOCONDRIAL E VIABILIDADE CELULAR

Após os respectivos tratamentos descritos anteriormente, as fatias hipocampais ou as frações sinaptossomais foram incubadas com MTT (0,5 mg/ml em tampão HEPES-salina) por 30 minutos a 37°C. O MTT (brometo de 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolium = “Thiazolyl blue”) é um sal de tetrazólio solúvel em água, o qual é convertido em um formazam púrpura após clivagem do anel de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais (LIU *et al.*, 1997). O formazam é solubilizado com a adição de dimetil sulfóxido (DMSO),

formando um composto colorido cuja densidade óptica é medida em Leitor de ELISA ($\lambda=550$ nm). A atividade mitocondrial (viabilidade celular) é diretamente proporcional à capacidade redutora sobre o MTT e, portanto, produção de cromógeno.

Para determinar um possível papel da $p38^{\text{MAPK}}$ sobre a viabilidade celular, as fatias também foram pré-incubadas por 30 minutos com o inibidor específico de $p38^{\text{MAPK}}$ SB203580 nas concentrações de 5 e $10\mu\text{M}$. A seguir as fatias foram expostas por 1 hora ao cádmio em concentração de $200\mu\text{M}$ na presença de SB203580. Após esse período o meio contendo metal foi retirado e as fatias analisadas ou submetidas por mais 2 horas de incubação com tampão HEPES-salina sem metal, mas contendo SB203580. Para controle fatias de hipocampo foram incubadas sem a presença de metal em tampão HEPES-salina ou tampão HEPES-salina contendo SB203580.

3.9-SEPARAÇÃO DE PROTEÍNAS

As fatias hipocampais foram postas em tampão de amostra (4% de SDS, 50mM de Tris, 100mM de EDTA e 8% de β -mercaptoetanol, pH 6.8) e fervidas por 3 minutos para permitir a solubilização do tecido. Foram usados $100\mu\text{l}$ de tampão de amostra por fatia. Cada fatia hipocampal de animais de 14 dias tinham em média $150\mu\text{g}$ de proteína. Em seguida era adicionada a solução de diluição de amostra (40% de glicerol, 25mM de Tris e Bromofenol Blue; pH 6.8) numa proporção solução de diluição/solução de amostra de 25:100 (v/v). As proteínas ($100\mu\text{g/poço}$) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE), usando gel de separação em gradiente de 7,5 a 15% e gel de entrada a 4% de acrilamida (BUNN *et al.*, 1995). Para preparo dos géis foi utilizado um aparato para gradiente BioRad®, que continha 2 compartimentos, A e B. No compartimento B, adicionava-

se 10ml da mistura de gel 7,5% (7,5% de Acrilamida/Bis-acrilamida 37,5:1 (w/w), 375mM de Tris, 0,1% de SDS, 0,06% de TEMED e 0,036% de persulfato de amônia; pH8.8) e no compartimento A, adicionava-se 10ml da mistura de gel 15% (15% de Acrilamida/Bis-acrilamida 37,5:1 (w/w), 375mM de Tris, 0,1% de SDS, 15% de Glicerol, 0,06% de TEMED e 0,036% de persulfato de amônia; pH 8.8). Após o preenchimento da placa o gel permanecia em repouso durante 1 hora para plena polimerização. Logo a seguir era adicionado o gel de entrada 4% (4% de Acrilamida/Bis-acrilamida 37,5:1 w/w, 125mM de Tris, 0,1% de SDS, 0,05% de TEMED e 0,1% de persulfato de amônia; pH 6.8) e sobre este um pente de 12 poços. Após 3 horas eram aplicadas as amostras para separação. A eletroforese foi realizada com corrente fixa de 5mA por placa e voltagem máxima de 130V durante a noite (aproximadamente 14 horas), em temperatura ambiente, utilizando-se os tampões superior (190mM de glicina, 25mM de Tris e 0,1% de SDS) e inferior (50mM de Tris; pH 8.3). Após a corrida, os géis foram submetidos à eletrotransferência. A figura 3 ilustra a padronização da técnica de SDS-PAGE em nosso laboratório, em gel corado com Coomassie Blue.

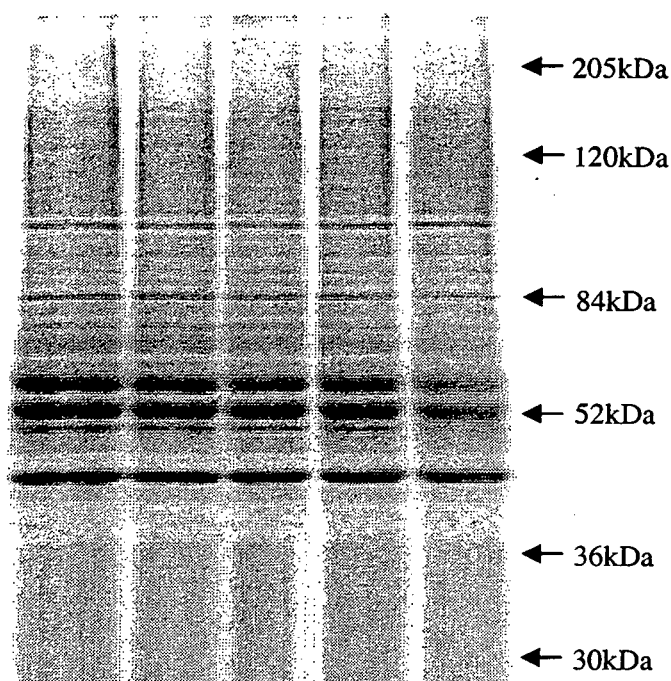


Figura 03-Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida contendo SDS, corada com Coomassie Blue. Amostras de fatias de hipocampo de ratos jovens.

Fatias de hipocampo de ratos jovens (14 dias) foram solubilizadas em tampão de eletroforese e as proteínas (100µg/poço) foram separadas em gel gradiente 7,5-15%.

3.10-ELETROTRANSFERÊNCIA E IMUNODETECÇÃO

Após a eletroforese o gel foi fixado durante 1 hora em solução fixadora (50% de metanol e 8% de ácido acético) e a seguir era lavado com tampão superior de eletroforese (25mM de Tris, 190mM de glicina e 0,1% de SDS) por 30 minutos. Após esse período, o gel foi equilibrado em tampão de transferência (50mM de Ácido Bórico e 4mM de EDTA; pH 8.9) durante 30 minutos. As proteínas foram transferidas do gel para a membrana de nitrocelulose no sentido do pólo negativo para o positivo, utilizando um “sanduíche” compreendido de espuma de suporte, papel filtro Whatman® 3MM, gel, nitrocelulose, novamente papel filtro e espuma de suporte. A transferência foi realizada a 4°C usando

corrente de 300mA por 3 horas em uma cuba contendo tampão de transferência. Após a eletrotransferência, as membranas foram coradas com solução de Ponceau (0,5% de Ponceau e 1% de ácido acético) para controle da transferência. As Figuras 4 e 5 mostram a padronização da técnica de eletrotransferência em nosso laboratório.

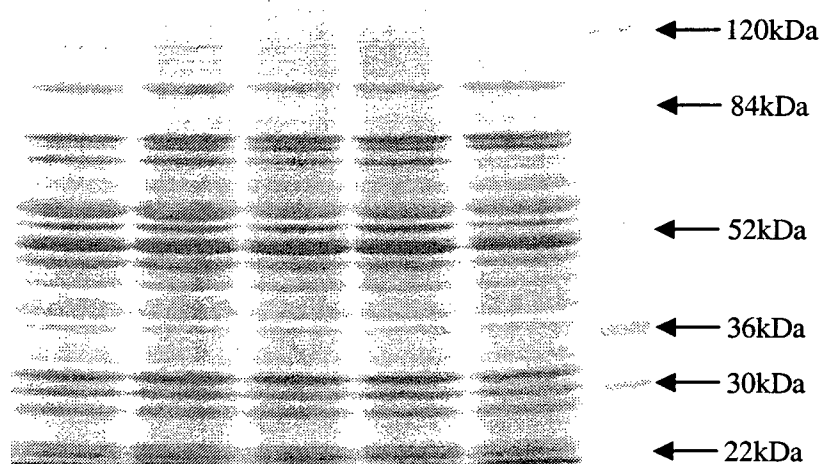


Figura 04-Membrana de nitrocelulose corada com Ponceau após eletrotransferência das proteínas.

Fatias de hipocampo de ratos jovens (14 dias) foram solubilizadas em tampão de eletroforese e as proteínas (100µg/poço) foram separadas em gel gradiente 7,5-15% e eletrotransferidas para a nitrocelulose utilizando corrente de 300mA durante 3 horas a 4°C.

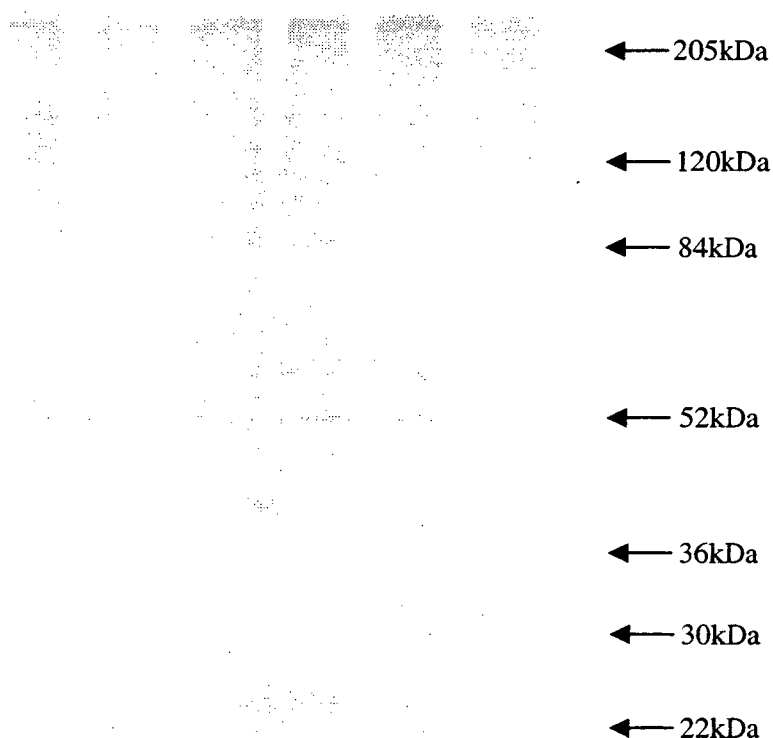


Figura 05-Gel de poliacrilamida correspondente à Figura 4 corado com Coomassie Blue após eletrotransferência

Após a eletrotransferência, as membranas foram lavadas com TBS (10mM de Tris, 150mM de NaCl, pH 7.5), para retirar o Ponceau, e a seguir foram bloqueadas por 1 hora com 5% de leite desnatado (Molico[®]) em TBS em temperatura ambiente. Após esse primeiro bloqueio, as membranas foram lavadas por 3 vezes de 5 minutos com TBS-T (Tween-20 0,05%, 10mM de Tris, 150mM de NaCl, pH7.5) e submetidas a um segundo bloqueio de 1 hora usando uma solução de 2,5% de gelatina (Royal[®] sem sabor) em TBS (BALDO, 1994; COLLINS & SIM, 1998; BOBROVSKAYA *et al.*, 2001). As membranas foram novamente lavadas 3 vezes (5 minutos cada) com TBS-T, para finalmente serem incubadas com os anticorpos primários: anti-fosfo-ERK1/2, anti-ERK1/2 total, anti-p38^{MAPK} total, anti-Hsp27, anti-Hsp70, anti-PP1 e anti-PP2A por um período de 2 horas a temperatura ambiente e com

anti-fosfo-p38^{MAPK} durante 12 horas a 4°C. Após as incubações, as membranas foram novamente lavadas com TBS-T (3 vezes de 5 minutos) e incubadas por 1 hora em temperatura ambiente com anticorpos secundários específicos (ligados à fosfatase alcalina ou à peroxidase). Para a detecção dos complexos imunes, as membranas foram lavadas 3 vezes (5 minutos) com TBS-T e 2 vezes com TBS, sendo que as bandas correspondentes às respectivas proteínas foram reveladas através de kits de desenvolvimento de cor, utilizando NBT e BCIP como substratos, em tampão de fosfatase alcalina (100mM de Tris, 100mM de NaCl e 5mM de MgCl₂; pH 9.5), ou kit ECL (quimiluminescência) conforme as recomendações do fabricante (Fig. 6). As medidas de fosforilação e/ou imunocnteúdo das proteínas foram realizadas através de densitometria.

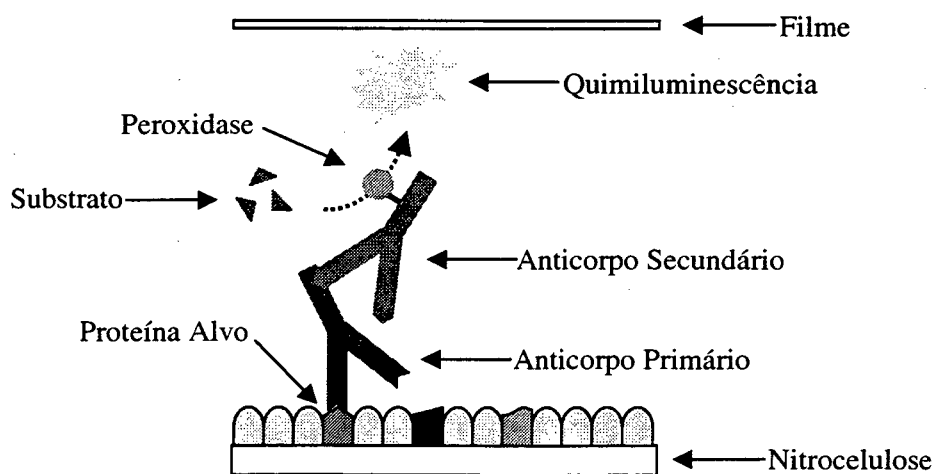


Figura 06-Imunodeteção, através de quimiluminescência, de um polipeptídio usando anticorpo específico.

3.11-DOSAGEM DE PROTEÍNA

As proteínas foram dosadas através do método de Peterson (1977). Sobre alíquotas de 2µl das amostras foram adicionados 398µl de água e 400µl do reagente de Lowry (0,2N de NaOH, 2,5% de SDS, 5% de Na₂CO₃, 0,2% de CuSO₄ e 0,1% de tartarato duplo de sódio e potássio). Em seguida foram adicionados 200µl do reagente de Folin 0,4N e incubadas por 30 minutos. A leitura foi realizada em 750nm e as concentrações foram obtidas através de uma curva padrão utilizando albumina sérica bovina (BSA).

3.12-ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados pelo teste ANOVA, seguido, quando apropriado, do teste de Duncan. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

4-RESULTADOS

Os resultados experimentais obtidos estão divididos em:

- Estudos dos efeitos de chumbo e cádmio *in vitro* utilizando fatias hipocampais de ratos jovens:
 - Avaliação da viabilidade celular em fatias hipocampais expostas ao chumbo ou cádmio;
 - Determinação da fosforilação de MAPKs por chumbo e cádmio;
 - Determinação do imunconteúdo de HSPs em resposta aos metais.
- Estudos dos efeitos de chumbo e cádmio *in vitro* utilizando fatias e sinaptossomas de ratos adultos:
 - Análise da viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos adultos expostas aos metais;
 - Análise da viabilidade de sinaptossomas expostos ao chumbo.
- Estudos dos efeitos de chumbo e cádmio *in vivo* em fatias hipocampais de ratos jovens:
 - Controle do ganho de peso corporal dos animais tratados;
 - Avaliação da viabilidade celular em fatias hipocampais obtidas de ratos expostos ao chumbo ou cádmio;

- Determinação da fosforilação de MAPKs em fatias de hipocampo;
- Avaliação do imunoconteúdo de HSPs e das proteínas fosfatases 1 (PP1) e 2A (PP2A), em fatias hipocampais.

4.1-ESTUDOS DOS EFEITOS DE CHUMBO E CÁDMIO *IN VITRO* UTILIZANDO FATIAS HIPOCAMPAIS DE RATOS JOVENS

4.1.1-Avaliação da Viabilidade Celular em Fatias Hipocampais Expostas ao Chumbo ou Cádmio

4.1.1.1-Determinação da Viabilidade Celular em Fatias de Hipocampo de Ratos Jovens Incubadas in vitro com Diferentes Concentrações de Chumbo ou Cádmio

Diversos estudos demonstram que os metais pesados podem prejudicar o metabolismo energético em algumas preparações celulares (GMEREK *et al.*, 1981; WALTON, 1982; DUMAS *et al.*, 1985; STRUZYNSKA *et al.*, 1997; AL-NASSER, 2000). Desta forma, foi determinado o efeito do chumbo e do cádmio sobre a viabilidade celular hipocampal. Fatias de hipocampo de ratos jovens (13-15 dias) foram incubadas com chumbo em concentrações de 1, 5, 10, 50 e 100 μ M ou com cádmio em concentrações de 5, 10, 50, 100 e 200 μ M por períodos de 1 e 3 horas. Para controle as fatias foram incubadas apenas com tampão HEPES-salina. A viabilidade celular, capacidade redutora sobre o MTT, foi expressa em percentagem do controle (considerado 100%). A Figura 7 mostra o efeito dos metais sobre a viabilidade celular em fatias hipocampais. O chumbo não causou alteração significativa da viabilidade em nenhuma das concentrações e tempos de incubação testados (Fig. 7A; Anexo 1). Entretanto, fatias incubadas com cádmio apresentaram diminuição significativa da viabilidade celular nas concentrações de 100 e 200 μ M, tanto em incubações de 1 hora como de 3 horas (Fig. 7B; Anexo 1).

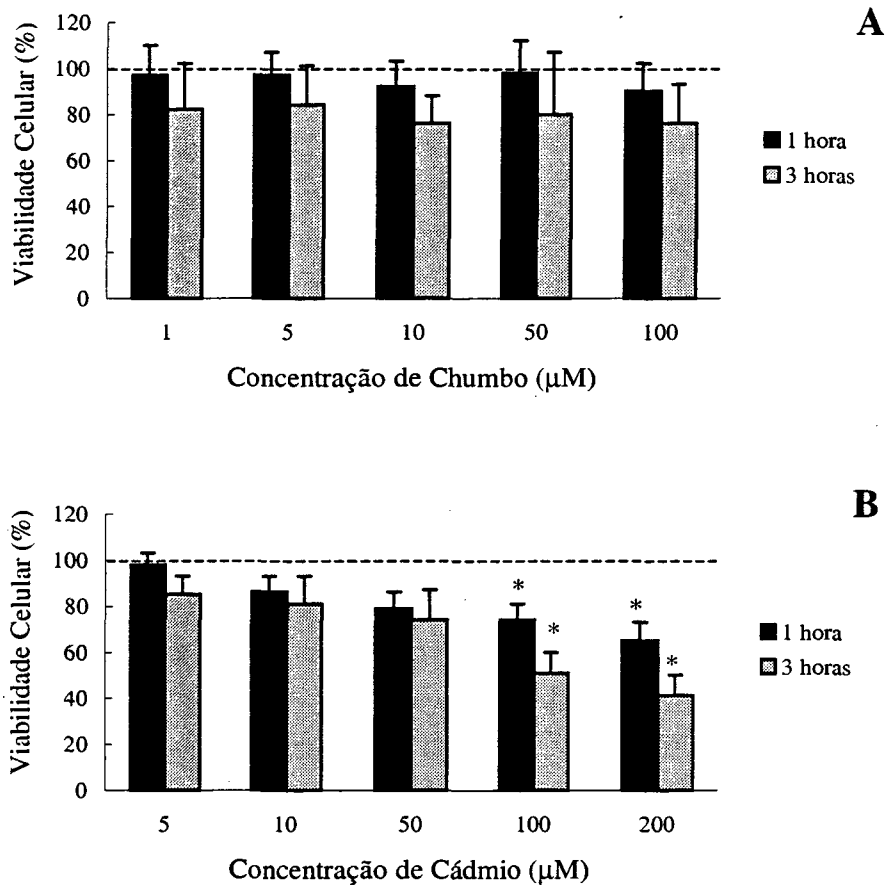


Figura 07-Efeito do chumbo (A) e cádmio (B) na redução do MTT em fatias de hipocampo de ratos jovens.

Fatias Hipocampais foram incubadas com diferentes concentrações de chumbo ou cádmio por períodos de 1 e 3 horas. Para controle fatias foram incubadas apenas com tampão HEPES-salina. A viabilidade foi determinada pela capacidade de redução do MTT. Resultados representam média \pm erro padrão e são expressos como percentuais do controle (considerado 100%). Chumbo, $n = 8$; cádmio, $n = 4$; * $p < 0,05$ em relação ao controle.

4.1.1.2-Efeito da Inibição de $p38^{MAPK}$ pelo SB203580 em Fatias Hipocampais de Ratos Jovens Expostas *in vitro* ao Cádmio

Metais pesados podem provocar morte celular, tanto apoptótica quanto necrótica (ALMAZAN *et al.*, 2000; YOSHIDA, 2001). Adicionalmente, foi demonstrada que a ativação de $p38^{MAPK}$ pelo cádmio causa apoptose em cultura de promonócitos (GALÀN *et al.*, 2000). Nesse sentido, foi analisado o efeito do inibidor específico de $p38^{MAPK}$, SB203580, sobre a viabilidade celular em fatias hipocampais de ratos jovens. Fatias de hipocampo foram pré-incubadas por 30 minutos com SB203580 em concentrações de 5 e 10 μ M. Após este período, as fatias foram expostas ao cádmio em concentração de 200 μ M na presença de inibidor durante 1 hora. Alternativamente, as fatias foram incubadas durante um período 2 horas apenas com o SB203580, mas sem exposição ao cádmio. Para controle fatias foram incubadas apenas com tampão HEPES-salina. A viabilidade celular, capacidade redutora sobre o MTT, foi expressa em percentagem do controle (considerado 100%). A Figura 8 (ver também Anexo 2) mostra que o inibidor SB203580 não foi capaz de proteger as células contra o efeito do cádmio sobre a viabilidade celular.

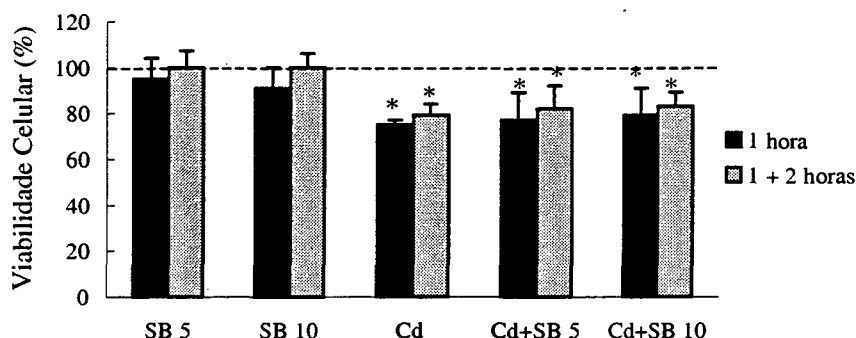


Figura 08-Efeito do SB203580 sobre a viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos jovens expostas ao cádmio.

Fatias hipocâmpais foram incubadas com cádmio na concentração de 200 μ M na presença ou não de SB203580. Para controle fatias foram incubadas apenas com tampão HEPES-salina. SB 5/1h, pré-incubação (30 min.) com HEPES-salina contendo SB 5 μ M + 1h de incubação com tampão HEPES contendo o inibidor (5 μ M); SB 10/1h, pré-incubação com HEPES-salina contendo SB 10 μ M + 1h de incubação com tampão HEPES contendo o inibidor (10 μ M); Cd/1h, pré-incubação com HEPES-salina + 1h de incubação com tampão HEPES-salina contendo 200 μ M de cádmio; Cd/SB5/1h, pré-incubação com HEPES-salina contendo 5 μ M de SB + 1h de incubação com tampão HEPES contendo 200 μ M de cádmio e em presença de SB (5 μ M); Cd/SB10/1h, pré-incubação com HEPES-salina contendo 10 μ M de SB + 1h de incubação com tampão HEPES contendo 200 μ M de cádmio e em presença de SB (10 μ M). Os tratamentos designados por 1 + 2 horas são iguais aos descritos para 1 hora, exceto que foi realizado um período de incubação adicional de 2 horas usando tampão com a mesma composição daquele usado na 1ª hora, exceto que o cádmio não era adicionado. A viabilidade foi determinada pela capacidade de redução do MTT. Resultados representam média \pm erro padrão e são expressos como percentuais do controle (considerado 100%). n = 4; * p < 0,05 em relação ao controle.

4.1.2-Determinação da Fosforilação de MAPKs por Chumbo e Cádmio

4.1.2.1-Análise da Fosforilação de ERK1/2 em Fatias de Hipocampo de Ratos Jovens Incubadas com Chumbo ou Cádmio *in vitro*

Estudos recentes demonstraram que o chumbo (RAMESH *et al.*, 1999; WILLIAMS *et al.*, 2000) e o cádmio (HUNG *et al.*, 1998a) podem modificar a fosforilação de ERK1/2 em culturas celulares. Entretanto, nenhum estudo mostrou a modulação de ERK no SNC. Dessa maneira, foi analisada a modulação de ERK1/2 em fatias hipocâmpais de ratos jovens incubadas com chumbo em concentrações de 1, 5, 10, 50 e 100 μ M e cádmio em concentrações de 5, 10, 50, 100 e 200 μ M em tempos de 1 e 3 horas. Para controle fatias foram incubadas apenas com tampão HEPES-salina. As Figuras 9A e 10A mostram os imunoblottings da fosforilação de ERK1/2 em fatias incubadas com chumbo em períodos de 1 e 3 horas, respectivamente. A quantificação das bandas é mostrada nas figuras 9B e 10B (ver também Anexo 3). A fosforilação de ERK foi expressa em percentagem do controle (considerado 100%). O chumbo não modificou a fosforilação das ERK1/2 em 1 hora de incubação. Por outro lado, no período de incubação de 3 horas, houve um aumento significativo da fosforilação de ERK1 em concentrações de 10, 50 e 100 μ M de chumbo.

Experimentos similares foram realizados em fatias incubadas com cádmio. Nas incubações de 1 hora, o cádmio causou aumento significativo na fosforilação de ERK1 na concentração de 200 μ M, e de ERK2 nas concentrações de 100 e 200 μ M (Fig. 11). Por outro lado, o cádmio aumentou significativamente a fosforilação de ERK1/2 nas concentrações de 100 e 200 μ M no tempo de incubação de 3 horas (Fig. 12).

Os metais não alteraram o imunoconteúdo das ERK1/2 em nenhuma das concentrações e tempos de incubação utilizados (dados não mostrados).

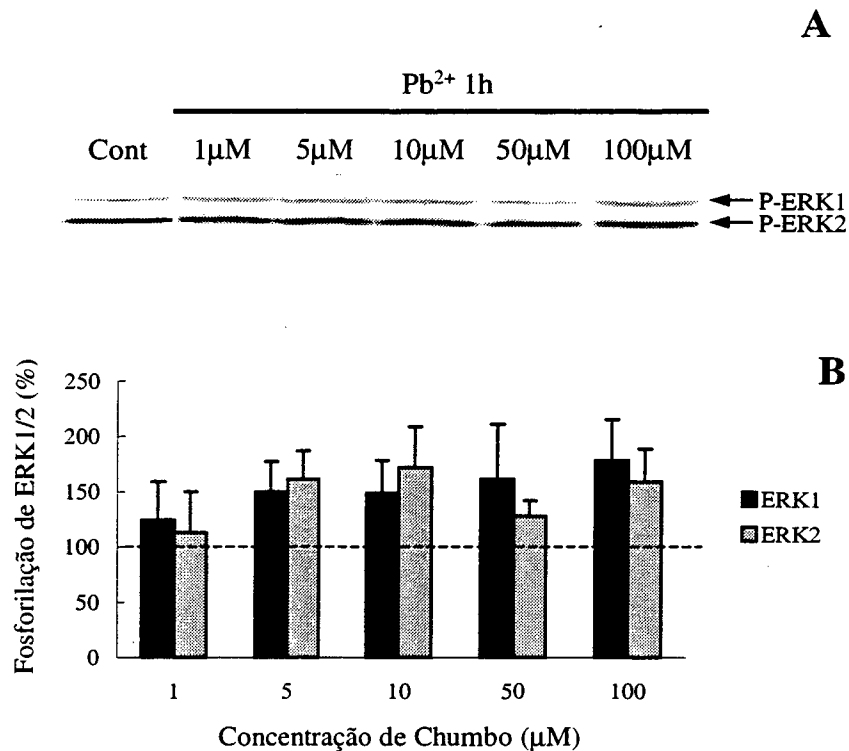


Figura 09-Efeito do chumbo sobre a fosforilação de ERK1/2 em fatias de hipocampo de ratos jovens em incubações de 1 hora. (A) Imunoblotting mostrando as bandas de fosfo-ERK1/2. (B) Quantificação da fosforilação das bandas.

Fatias hipocampais foram incubadas com diferentes concentrações de chumbo durante 1 hora. Para controle fatias foram incubadas apenas com tampão HEPES-salina. A fosforilação de ERK foi determinada através da densitometria dos imunoblottings. Os resultados representam a média \pm erro padrão das densidades ópticas de cada banda e são expressas como percentuais relativos ao controle (considerado 100%). $n = 6$; $p > 0,05$, diferenças não significativas em relação ao controle.

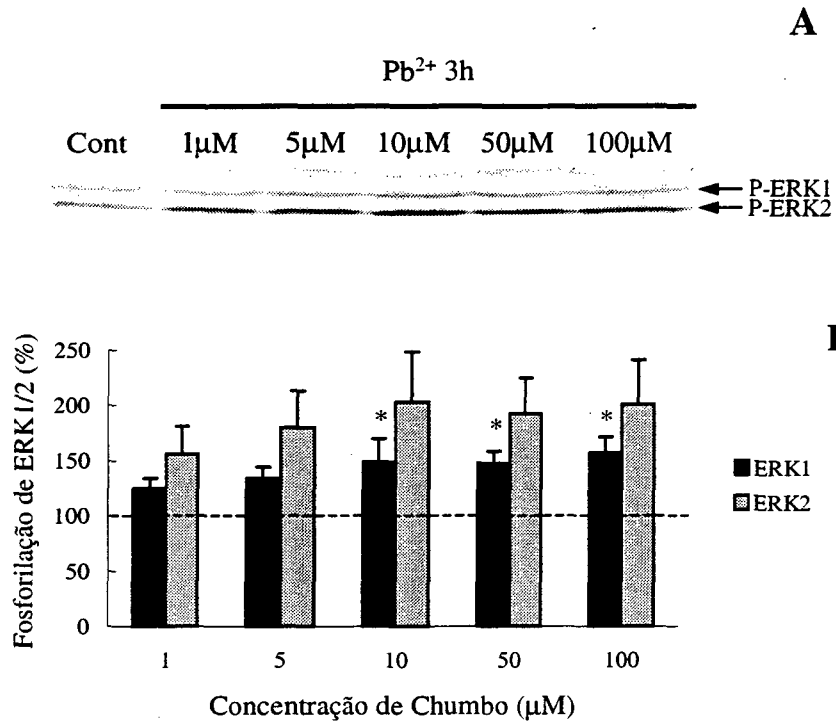


Figura 10-Efeito do chumbo sobre a fosforilação de ERK1/2 em fatias de hipocampo de ratos jovens em incubações de 3 horas. (A) Imunoblotting mostrando as bandas de fosfo-ERK1/2. (B) Quantificação da fosforilação das bandas.

Fatias hipocâmpais foram incubadas com diferentes concentrações de chumbo durante 3 horas. Para controle fatias foram incubadas apenas com tampão HEPES-salina. A fosforilação de ERK foi determinada através da densitometria dos imunoblottings. Os resultados representam a média \pm erro padrão das densidades ópticas de cada banda e são expressas como percentuais relativos ao controle (considerado 100%). n = 6; * p < 0,05 em relação ao controle.

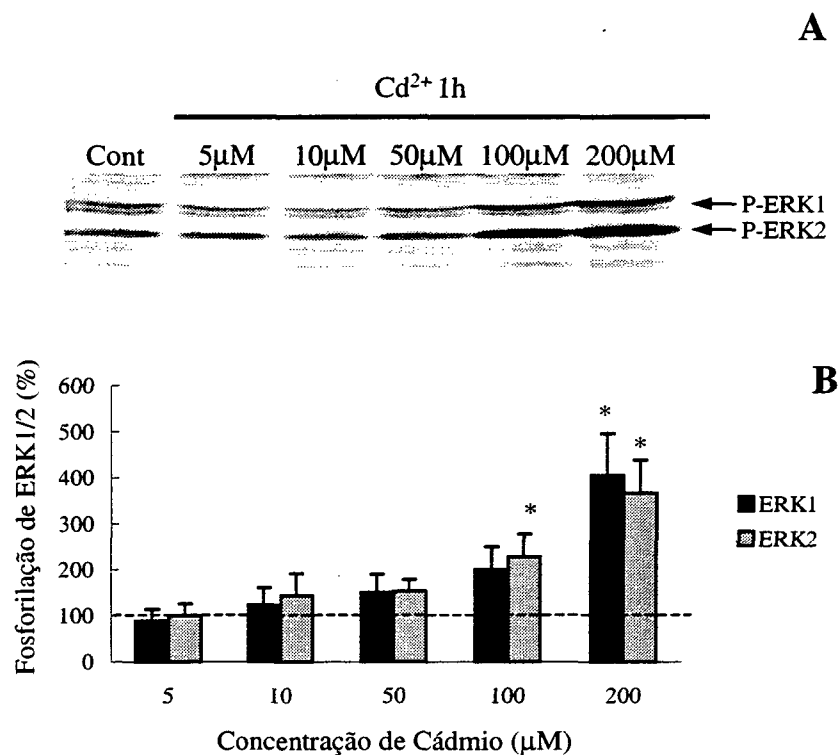


Figura 11-Efeito do cádmio sobre a fosforilação de ERK1/2 em fatias de hipocampo de ratos jovens em incubações de 1 hora. (A) Imunoblotting mostrando as bandas de fosfo-ERK1/2. (B) Quantificação da fosforilação das bandas.

Fatias hipocampais foram incubadas com diferentes concentrações de cádmio durante 1 hora. Para controle fatias foram incubadas apenas com tampão HEPES-salina. A fosforilação de ERK foi determinada através da densitometria dos imunoblottings. Os resultados representam a média \pm erro padrão das densidades ópticas de cada banda e são expressas como percentuais relativos ao controle (considerado 100%). n = 6; * p < 0,05 em relação ao controle.

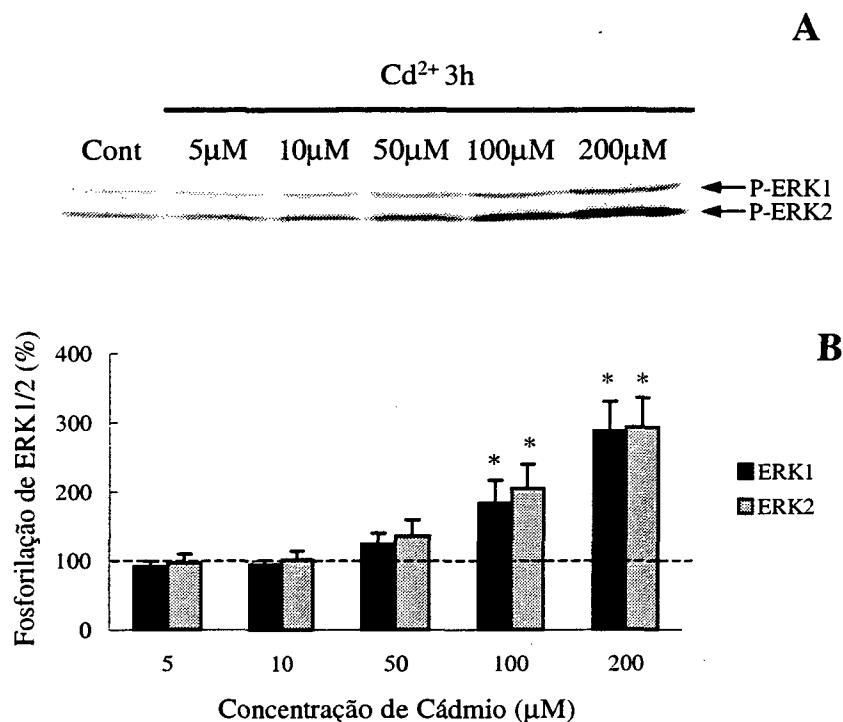


Figura 12-Efeito do cádmio sobre a fosforilação de ERK1/2 em fatias de hipocampo de ratos jovens em incubações de 3 horas. (A) Imunoblotting mostrando as bandas de fosfo-ERK1/2. (B) Quantificação da fosforilação das bandas.

Fatias hipocámpais foram incubadas com diferentes concentrações de cádmio durante 3 horas. Para controle fatias foram incubadas apenas com tampão HEPES-salina. A fosforilação de ERK foi determinada através da densitometria dos imunoblottings. Os resultados representam a média \pm erro padrão das densidades ópticas de cada banda e são expressas como percentuais relativos ao controle (considerado 100%). n = 6; * p < 0,05 em relação ao controle.

4.1.2.2-Análise da Fosforilação de p38^{MAPK} em Fatias de Hipocampo de Ratos Jovens Incubadas com Chumbo ou Cádmio *in vitro*

A p38^{MAPK} é uma enzima que é ativada por diversos tipos de estresse ambiental, incluindo metais pesados. Estudos demonstraram a ativação de p38^{MAPK} por cádmio e chumbo em modelos de culturas celulares (GALÀN *et al.*, 2000; LEAL *et al.*, 2002), entretanto, até o momento não foi demonstrada a modulação dessa quinase pelos metais em tecidos cerebrais. Foi analisada a modulação de p38^{MAPK} em fatias hipocámpais de ratos jovens incubadas com chumbo em concentrações de 1, 5, 10, 50 e 100µM e cádmio em concentrações de 5, 10, 50, 100 e 200µM em tempos de 1 e 3 horas. Para controle fatias foram incubadas apenas com tampão HEPES-salina. As Figuras 13A e 14A mostram os imunoblottings da fosforilação de p38^{MAPK} em fatias incubadas com chumbo em períodos de 1 e 3 horas, respectivamente. A quantificação das bandas é mostrada nas figuras 13B e 14B (ver também Anexo 4). A fosforilação de p38^{MAPK} foi expressa em porcentagem do controle (considerado 100%). Nas fatias incubadas com chumbo, durante 1 hora nas concentrações entre 1 e 100µM, não houve aumento significativo na fosforilação de p38^{MAPK} (Fig. 13). Porém, em incubações de 3 horas o chumbo aumentou significativamente a fosforilação de p38^{MAPK} nas concentrações de 5, 10, 50 e 100µM (Fig 14).

Nas análises das fatias dos experimentos utilizando cádmio em incubações de 1 hora, houve aumento significativo da fosforilação de p38^{MAPK} nas concentrações de 100 e 200µM (Fig. 15; ver também Anexo 4). No período de incubação de 3 horas houve aumento significativo da fosforilação de p38^{MAPK} em todas as concentrações usadas (Fig. 16; ver também Anexo 4).

Os metais não produziram alteração do imunoconteúdo de p38^{MAPK} (dados não mostrados).

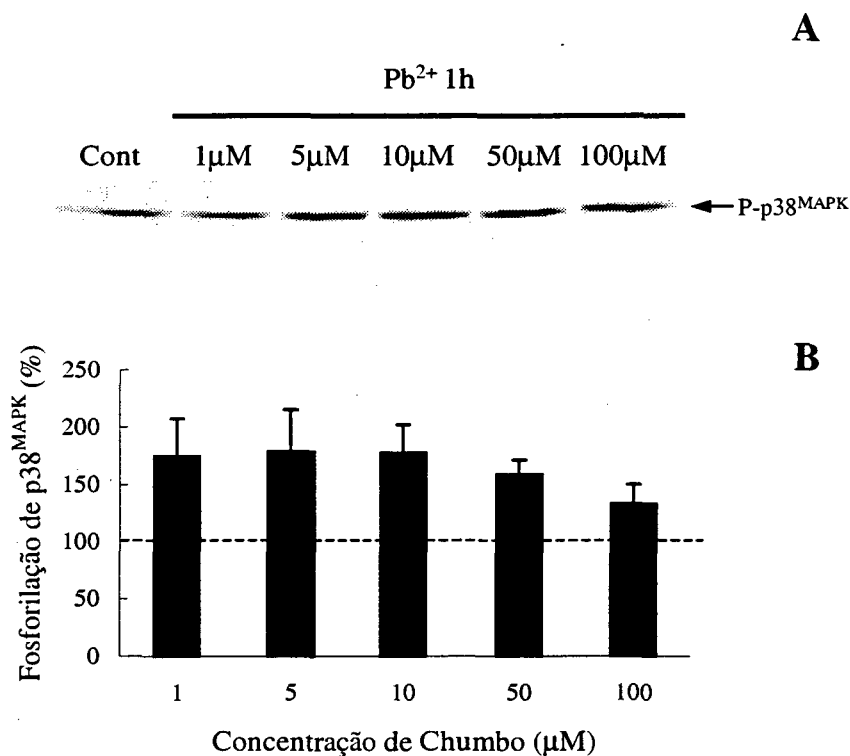


Figura 13-Efeito do chumbo sobre a fosforilação de p38^{MAPK} em fatias de hipocampo de ratos jovens em incubações de 1 hora. (A) Imunoblotting mostrando as bandas de fosfo-p38^{MAPK}. (B) Quantificação da fosforilação das bandas.

Fatias hipocampais foram incubadas com diferentes concentrações de chumbo durante 1 hora. Para controle fatias foram incubadas apenas com tampão HEPES-salina. A fosforilação de p38^{MAPK} foi determinada através da densitometria dos imunoblottings. Os resultados representam a média \pm erro padrão das densidades ópticas de cada banda e são expressas como percentuais relativos ao controle (considerado 100%). n = 6; p > 0,05, diferenças não significativas em relação ao controle.

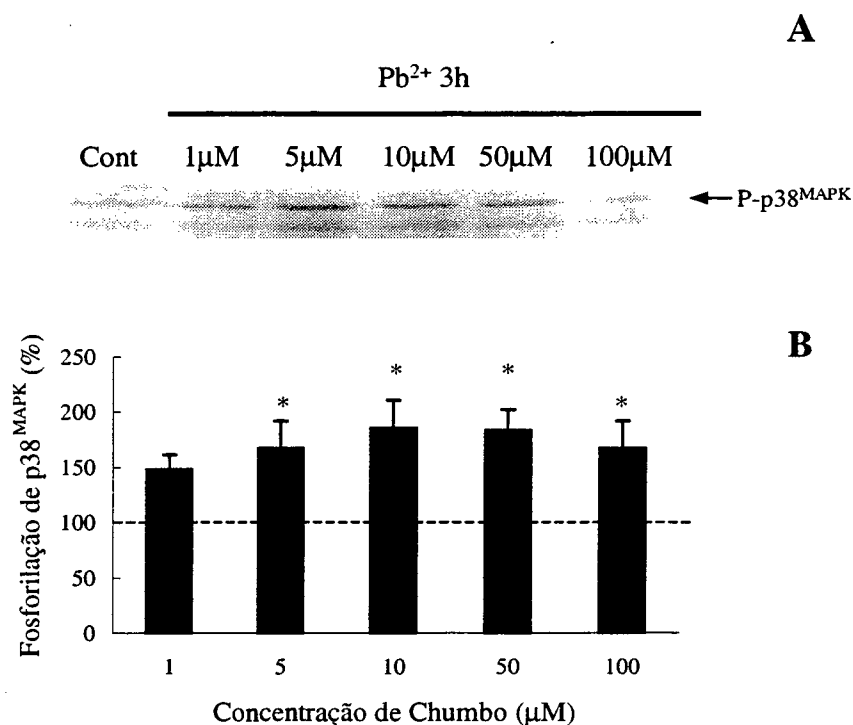


Figura 14-Efeito do chumbo sobre a fosforilação de p38^{MAPK} em fatias de hipocampo de ratos jovens em incubações de 3 horas. (A) Imunoblotting mostrando as bandas de fosfo-p38^{MAPK}. (B) Quantificação da fosforilação das bandas.

Fatias hipocampais foram incubadas com diferentes concentrações de chumbo durante 3 horas. Para controle fatias foram incubadas apenas com tampão HEPES-salina. A fosforilação de p38^{MAPK} foi determinada através da densitometria dos imunoblottings. Os resultados representam a média \pm erro padrão das densidades ópticas de cada banda e são expressas como percentuais relativos ao controle (considerado 100%). n = 6; * p < 0,05 em relação ao controle.

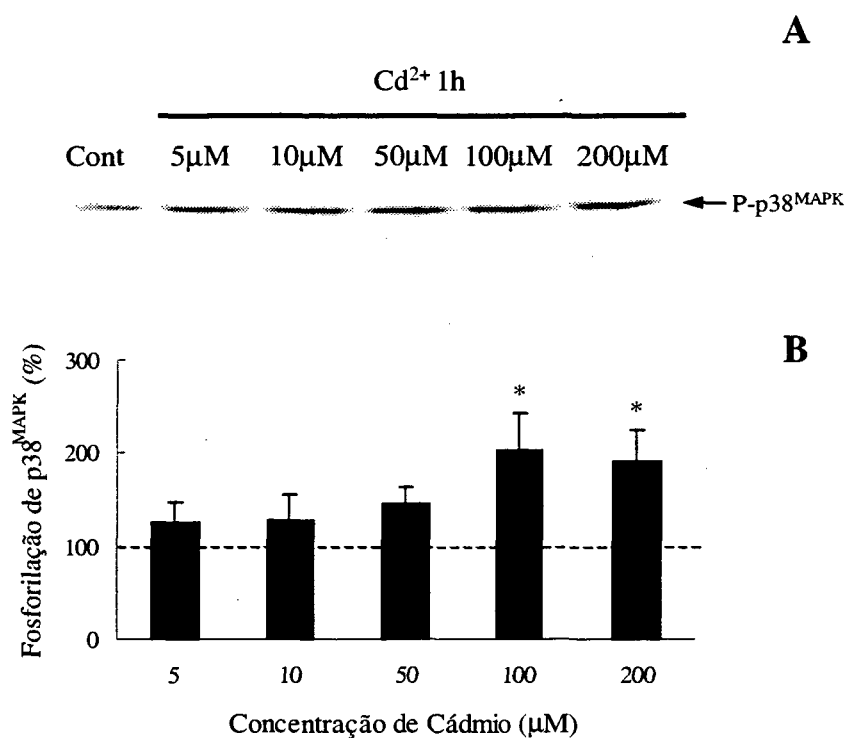


Figura 15-Efeito do cádmio sobre a fosforilação de p38^{MAPK} em fatias de hipocampo de ratos jovens em incubações de 1 hora. (A) Imunoblotting mostrando as bandas de fosfo- p38^{MAPK} . (B) Quantificação da fosforilação das bandas.

Fatias hipocâmpais foram incubadas com diferentes concentrações de cádmio durante 1 hora. Para controle fatias foram incubadas apenas com tampão HEPES-salina. A fosforilação de p38^{MAPK} foi determinada através da densitometria dos imunoblottings. Os resultados representam a média \pm erro padrão das densidades ópticas de cada banda e são expressas como percentuais relativos ao controle (considerado 100%). $n = 6$; * $p < 0,05$ em relação ao controle.

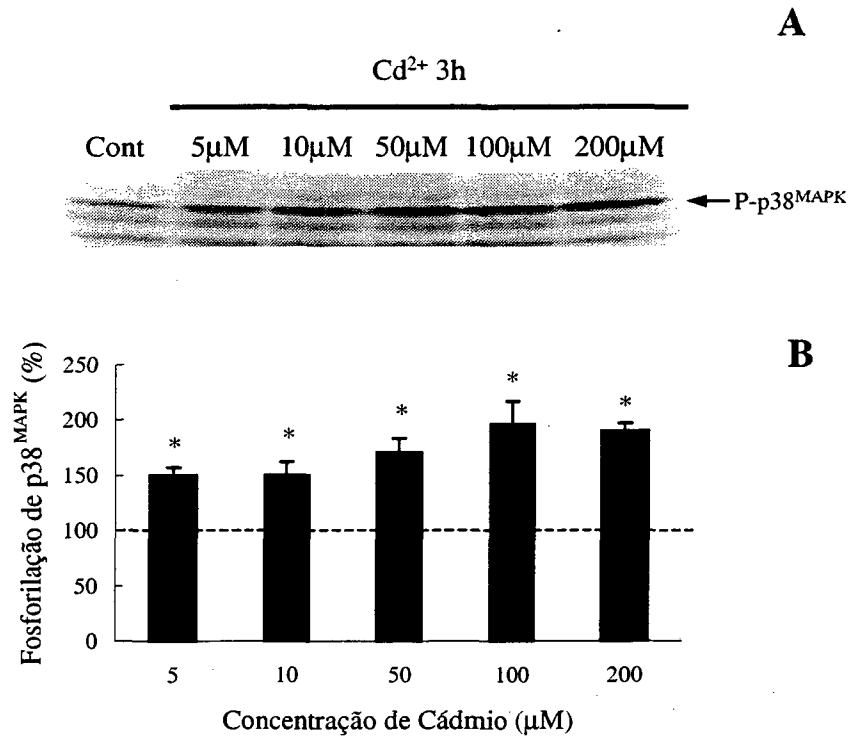


Figura 16-Efeito do cádmio sobre a fosforilação de p38^{MAPK} em fatias de hipocampo de ratos jovens em incubações de 3 horas. (A) Imunoblotting mostrando as bandas de fosfo-p38^{MAPK}. (B) Quantificação da fosforilação das bandas.

Fatias hipocâmpais foram incubadas com diferentes concentrações de cádmio durante 3 horas. Para controle fatias foram incubadas apenas com tampão HEPES-salina. A fosforilação de p38^{MAPK} foi determinada através da densitometria dos imunoblottings. Os resultados representam a média \pm erro padrão das densidades ópticas de cada banda e são expressas como percentuais relativos ao controle (considerado 100%). n = 6; * p < 0,05 em relação ao controle.

4.1.3-Determinação do Imunoconteúdo de HSPs em Resposta aos Metais

Uma das mais importantes respostas das células ao estresse é o aumento da expressão de algumas HSPs (OHTSUKA & SUZUKI, 2000). Metais pesados são contaminantes que provocam esse fenômeno (HUNG *et al.*, 1998a e 1998b; QIAN *et al.*, 2000). Nesse sentido, o imunoconteúdo das proteínas de choque térmico foi analisada em fatias de hipocampo de ratos jovens expostas ao chumbo em concentrações de 1, 5, 10, 50 e 100 μ M e cádmio em concentrações de 5, 10, 50, 100 e 200 μ M, em incubações de 3 horas. Para controle fatias foram incubadas apenas com tampão HEPES-salina. As Figuras 17 e 18 mostram blottings representativos dos imunoconteúdos de Hsp27 e Hsp70, respectivamente. Análise densitométrica também foi realizada (dados não mostrados). Não foram observadas diferenças significativas no conteúdo de Hsp27 (Fig. 17) e Hsp70 (Fig. 18) no tempo e nas concentrações utilizadas para ambos os metais.

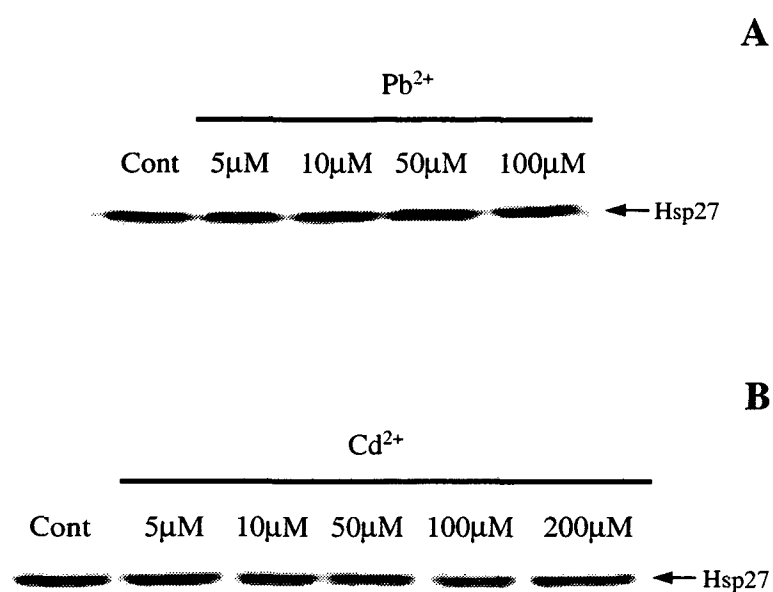


Figura 17-Efeito do chumbo (A) e cádmio (B) sobre o imunoconteúdo de Hsp27 em fatias de hipocampo de ratos jovens em incubações de 3 horas.

Fatias hipocâmpais foram incubadas com diferentes concentrações de chumbo ou cádmio durante 3 horas. Para controle fatias foram incubadas apenas com tampão HEPES-salina. As figuras A e B apresentam imunoblottings representativos dos efeitos do chumbo e cádmio, respectivamente; n = 4.

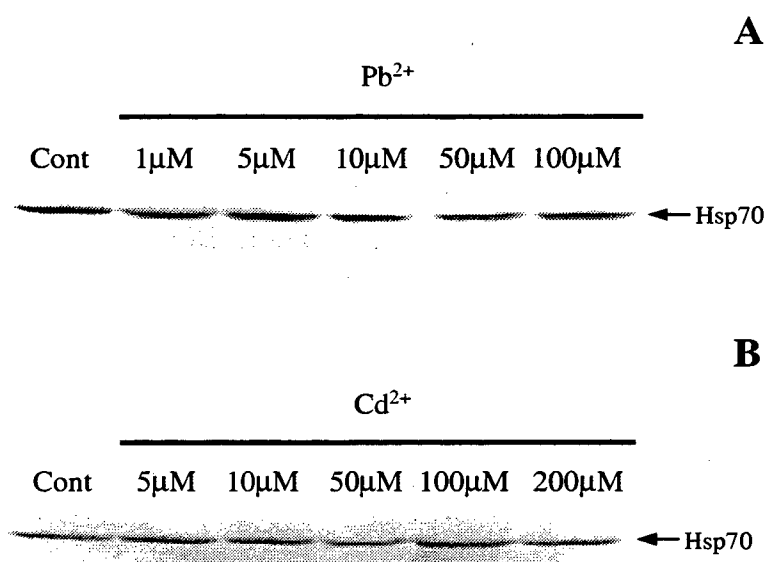


Figura 18-Efeito do chumbo (A) e cádmio (B) sobre o imunoconteúdo de Hsp70 em fatias de hipocampo de ratos jovens em incubações de 3 horas.

Fatias hipocampais foram incubadas com diferentes concentrações de chumbo ou cádmio durante 3 horas. Para controle fatias foram incubadas apenas com tampão HEPES-salina. As figuras A e B apresentam imunoblottings representativos dos efeitos do chumbo e cádmio, respectivamente; n = 4.

4.2-ESTUDOS DOS EFEITOS DE CHUMBO E CÁDMIO *IN VITRO* UTILIZANDO FATIAS E SINAPTOSSOMAS DE RATOS ADULTOS

4.2.1-Análise da Viabilidade Celular em Fatias de Hipocampo de Ratos Adultos Expostas aos Metais

Para determinar possíveis diferenças de sensibilidade aos metais em função da idade, foi avaliada a viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos adultos. As fatias foram incubadas com chumbo em concentrações de 1, 5, 10, 50 e 100 μ M ou com cádmio em concentrações de 5, 10, 50, 100 e 200 μ M durante 1 ou 3 horas. Para controle fatias foram incubadas apenas com tampão HEPES-salina. A viabilidade celular, capacidade redutora sobre o MTT, foi expressa em percentagem do controle (considerado 100%). A Figura 19 mostra o efeito dos metais sobre a viabilidade celular em fatias hipocampais de ratos adultos. Não foram observadas diferenças significativas da viabilidade das fatias nas concentrações de chumbo utilizadas nos períodos de 1 e 3 horas (Fig. 19A; Anexo 5). Por outro lado, o cádmio causou diminuição significativa na viabilidade celular na concentração de 200 μ M no período de 1 hora e nas concentrações de 50, 100 e 200 μ M nas incubações de 3 horas (Fig. 19B; Anexo 5)

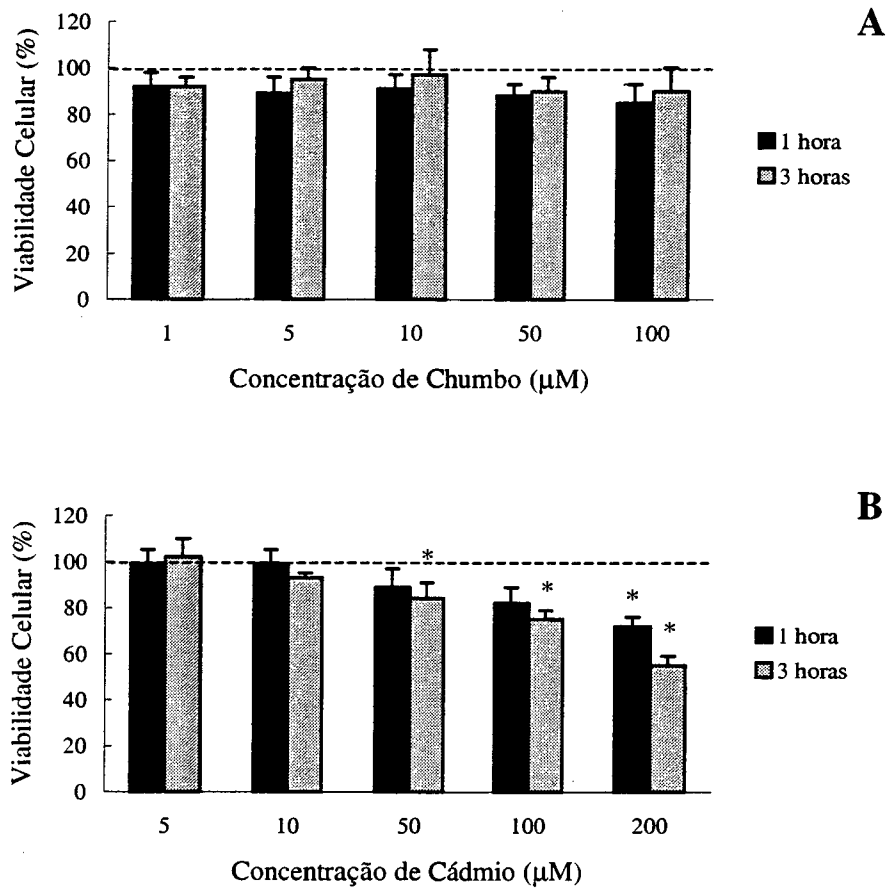


Figura 19-Efeito do chumbo (A) e cádmio (B) na redução do MTT em fatias de hipocampo de ratos adultos.

Fatias Hipocampais foram incubadas com diferentes concentrações de chumbo ou cádmio durante 1 e 3 horas. Para controle fatias foram incubadas apenas com tampão HEPES-salina. A viabilidade foi determinada pela capacidade de redução do MTT. Resultados representam média \pm erro padrão e são expressos como percentuais do controle (considerado 100%); $n = 4$; * $p < 0,05$ em relação ao controle.

4.2.2-Análise da Viabilidade de Sinaptossomas Expostos ao Chumbo

Diversos estudos demonstram o efeito deletério do chumbo sobre o metabolismo mitocondrial em sinaptossomas (GMEREK *et al.*, 1981; WALTON *et al.*, 1982; DUMAS *et al.*, 1985; STRUZYNSKA *et al.*, 1997). O objetivo de determinar a viabilidade de sinaptossomas expostos ao chumbo foi verificar a sensibilidade do sinaptossoma (terminal nervoso destacado) ao metal, e comparar estes resultados com preparações de fatias (que mantém a interação neurônio-glia). Frações sinaptossomais de córtex e hipocampo foram incubadas com chumbo em concentrações variando de 1, 5, 10, 50 e 100µM em tempos de 20, 40 e 60 minutos. Para controle frações foram incubadas apenas com tampão HEPES-salina. A viabilidade celular, capacidade redutora sobre o MTT, foi expressa em percentagem do controle (considerado 100%). Os resultados mostram que há diminuição da viabilidade sinaptossomal de maneira dependente do tempo de exposição e da concentração do metal nas preparações sinaptossomais de ambas as regiões do cérebro (Fig. 20; Anexo 6). As diminuições da atividade mitocondrial foram significativas nas concentrações de 50 e 100µM, quando comparadas ao controle.

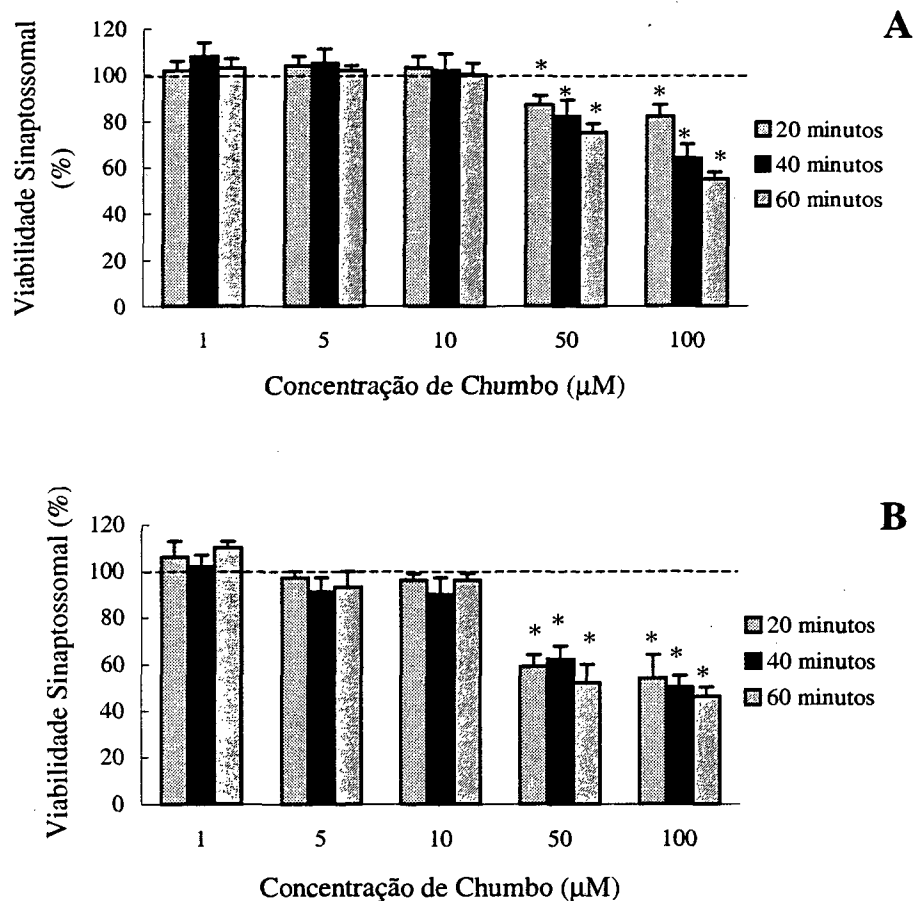


Figura 20-Efeito do chumbo na redução do MTT em sinaptossomas de córtex (A) e hipocampo (B) de ratos adultos, em incubações de 20, 40 e 60 minutos.

Frações sinaptossomais de córtex e hipocampo foram incubadas com diferentes concentrações de chumbo por períodos de 20, 40 e 60 minutos. Para controle frações foram incubadas apenas com tampão HEPES-salina. A viabilidade foi determinada pela capacidade de redução do MTT. Resultados representam média \pm erro padrão e são expressos como percentuais do controle (considerado 100%). Córtex, $n = 8$; hipocampo, $n = 3$; * $p < 0,05$ em relação ao controle.

4.3-ESTUDOS DOS EFEITOS DE CHUMBO E CÁDMIO EM FATIAS HIPOCAMPAIS DE RATOS JOVENS EXPOSTOS *IN VIVO*

Como observado anteriormente nos resultados referentes à modulação de ERK e p38^{MAPK} *in vitro*, foi nosso interesse também analisar os efeitos do chumbo e do cádmio em fatias de hipocampo obtidas de ratos expostos *in vivo* aos metais. Nesse sentido, ninhadas de ratos foram tratadas por via intraperitoneal (IP) com salina (NaCl a 0,9%; controle) e chumbo ou com salina e cádmio.

Após o período de tratamento as fatias hipocampais dos animais foram preparadas para a realização das análises bioquímicas. Em nosso estudo foi analisado o ganho de peso corporal dos animais do 8º ao 14º dia pós-natal, foi realizada a análise da viabilidade celular, a modulação da fosforilação de ERK e de p38^{MAPK} e o imunoconteúdo das proteínas Hsp27, Hsp70 e das subunidades catalíticas de PP1 e PP2A.

4.3.1-Controle do Ganho de Peso Corporal dos Animais Tratados com Chumbo e Cádmio

Para averiguar possíveis efeitos sistêmicos durante os tratamentos com chumbo e cádmio, foi realizado o controle do ganho de peso das ninhadas. O ganho de peso foi monitorado durante todo o período de tratamento e também nos 2 dias subsequentes a este período, ou seja, do 8º dia pós-natal até o 14º dia pós-natal. Os resultados representam a média do peso dos animais em gramas (g). As Figuras 21A e 21B mostram, respectivamente, o efeito do chumbo e do cádmio no ganho de peso de ratos jovens. Durante os períodos

analisados, não foram observadas alterações nas curvas de crescimento dos animais tratados com os metais (Fig. 21).

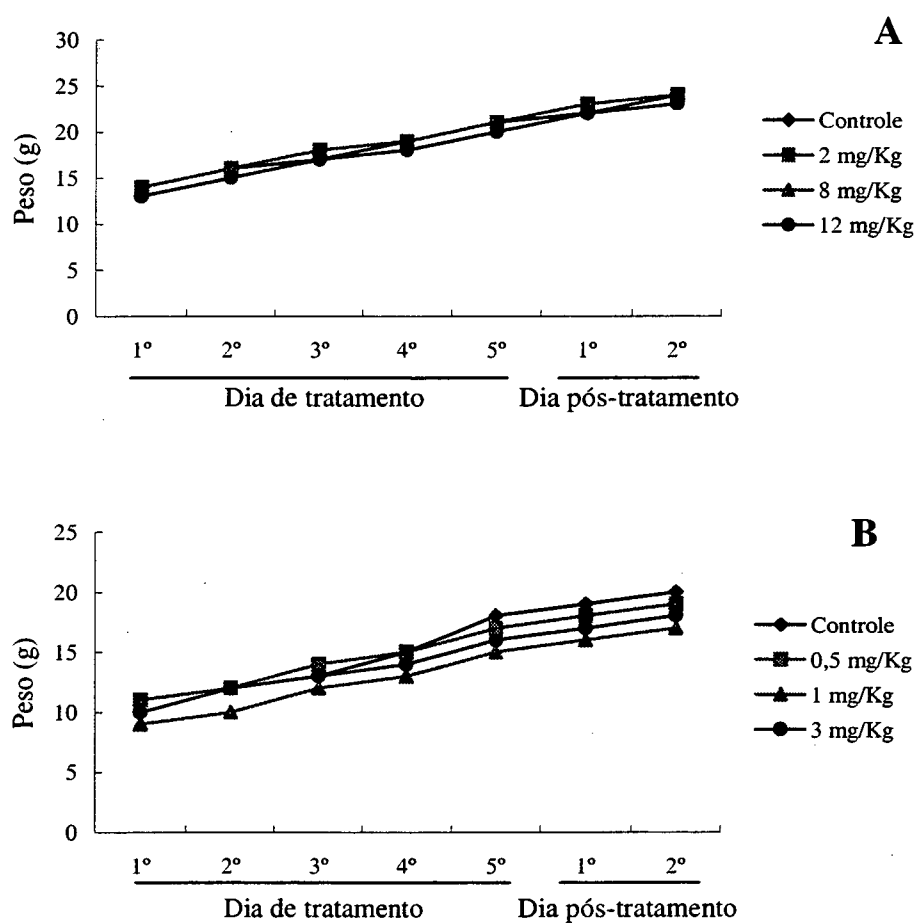


Figura 21-Ganho de peso corporal dos animais tratados *in vivo* com chumbo (A) e cádmio (B).

Ratos com 8 dias de idade foram tratados com salina (controle) e com diferentes doses de chumbo ou cádmio durante os 5 dias de tratamento e os 2 dias após o tratamento. O ganho de peso foi realizado através de medições diárias. Os resultados representam a média do peso dos animais em gramas (g); n = 8.

4.3.2-Avaliação da Viabilidade Celular em Fatias Hipocampais Obtidas de Ratos Expostos ao Chumbo ou Cádmio

Uma das ações dos metais é a capacidade de ocasionar morte celular. Desta forma foi importante determinar a viabilidade celular, capacidade redutora sobre o MTT, nas fatias hipocampais obtidas dos animais expostos *in vivo* ao chumbo ou cádmio. Os resultados não mostraram diferenças significativas na capacidade de redução do MTT entre os animais tratados com chumbo ou cádmio e os controles (Fig. 22A e B).

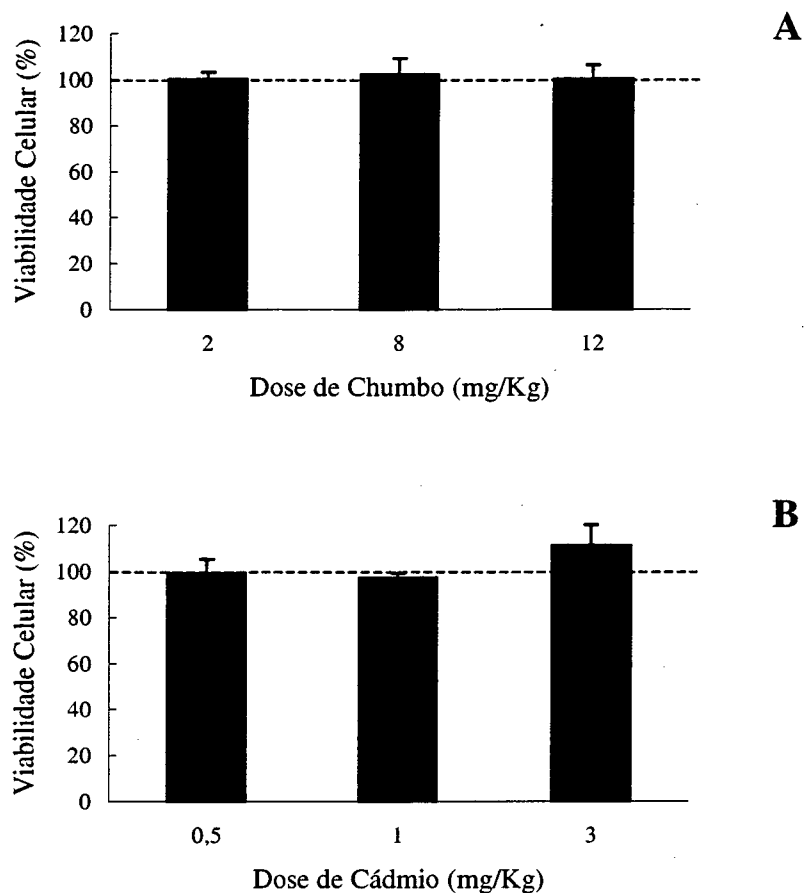


Figura 22-Efeito do chumbo (A) e cádmio (B) na redução do MTT em fatias de hipocampo de ninhadas de ratos jovens tratados *in vivo*.

Ratos com 8 dias de idade foram tratados com salina (controle) e com diferentes doses de chumbo ou cádmio durante 5 dias consecutivos. No 14º dia os animais foram mortos e os hipocampus retirados e fatiados para análise. A viabilidade das fatias foi determinada pela capacidade de redução do MTT. Resultados representam média \pm erro padrão e são expressos como percentuais do controle (considerado 100%); $n = 8$.

4.3.3-Determinação da Fosforilação de MAPKs em Fatias de Hipocampo

4.3.3.1-Análise da Fosforilação de ERK1/2 em Fatias de Hipocampo de Ratos Jovens Tratados com Chumbo ou Cádmio *in vivo*

O efeito do chumbo e do cádmio sobre a fosforilação das ERK1/2 em fatias de hipocampo de ratos jovens tratados *in vivo* com os metais foi avaliado através de imunoblotting. As Figuras 23A e 24A mostram o imunoblotting do efeito do chumbo e do cádmio, respectivamente, sobre a fosforilação das ERK1/2. A quantificação das bandas é mostrada nas figuras 23C e 24C (ver também Anexo 7). A fosforilação das ERK1/2 foi expressa em percentagem do controle (considerado 100%). Houve aumento significativo da fosforilação das ERK1/2 em todas as doses de chumbo utilizadas. Por outro lado, o cádmio aumentou a fosforilação de ERK1 somente na dose de 3mg/kg e de ERK2 nas doses de 1 e 3mg/kg (Fig. 24).

Os metais não produziram alteração no imunoconteúdo das ERK1/2 (Fig. 23B e 24B).

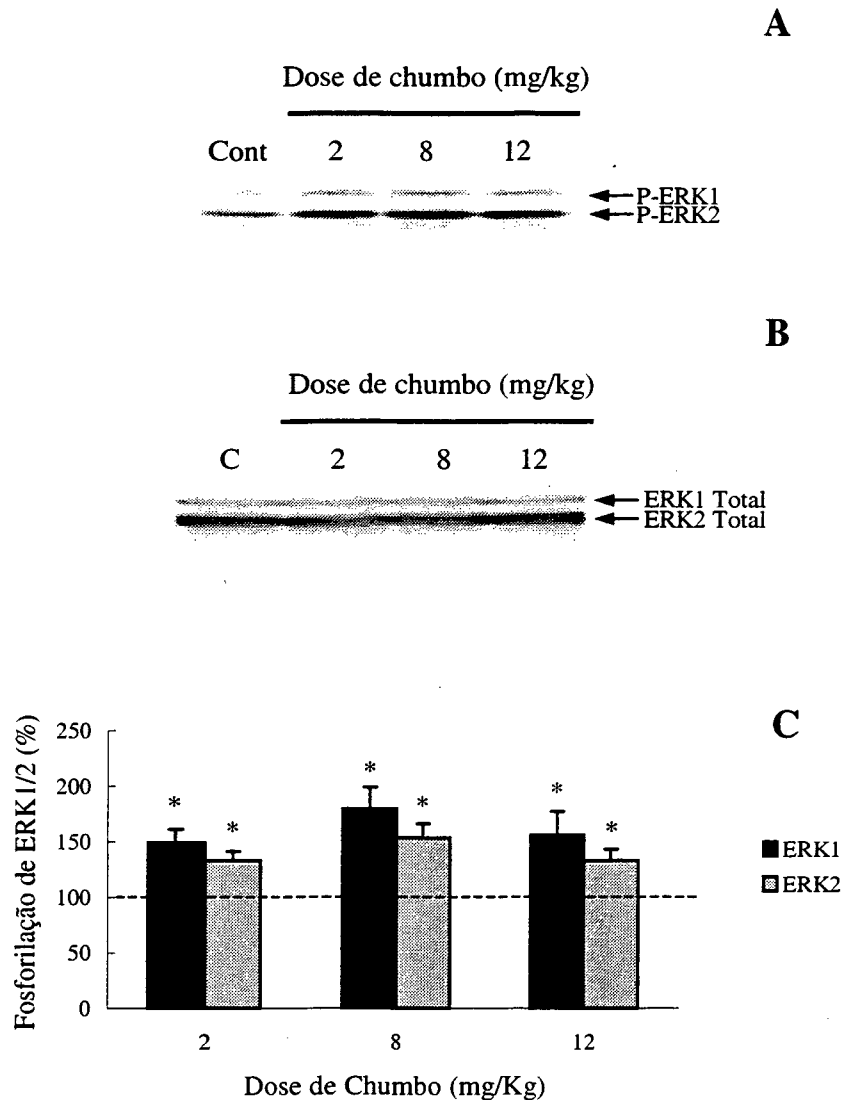


Figura 23-Efeito do chumbo sobre a fosforilação de ERK1/2 em fatias de hipocampo de ratos jovens tratados *in vivo*. (A) Imunoblotting mostrando as bandas de fosfo-ERK1/2. (B) Imunoblotting mostrando o conteúdo de ERK1/2. (C) Quantificação da fosforilação das bandas.

Ratos com 8 dias de idade foram tratados com salina (controle) e com diferentes doses de chumbo durante 5 dias consecutivos. No 14º dia os animais foram mortos e os hipocampus retirados para análise. A fosforilação de ERK1/2 foi determinada através da densitometria dos imunoblottings. Os resultados representam a média \pm erro padrão das densidades ópticas de cada banda e são expressas como percentuais relativos ao controle (considerado 100%). $n = 8$; * $p < 0,05$ em relação ao controle.

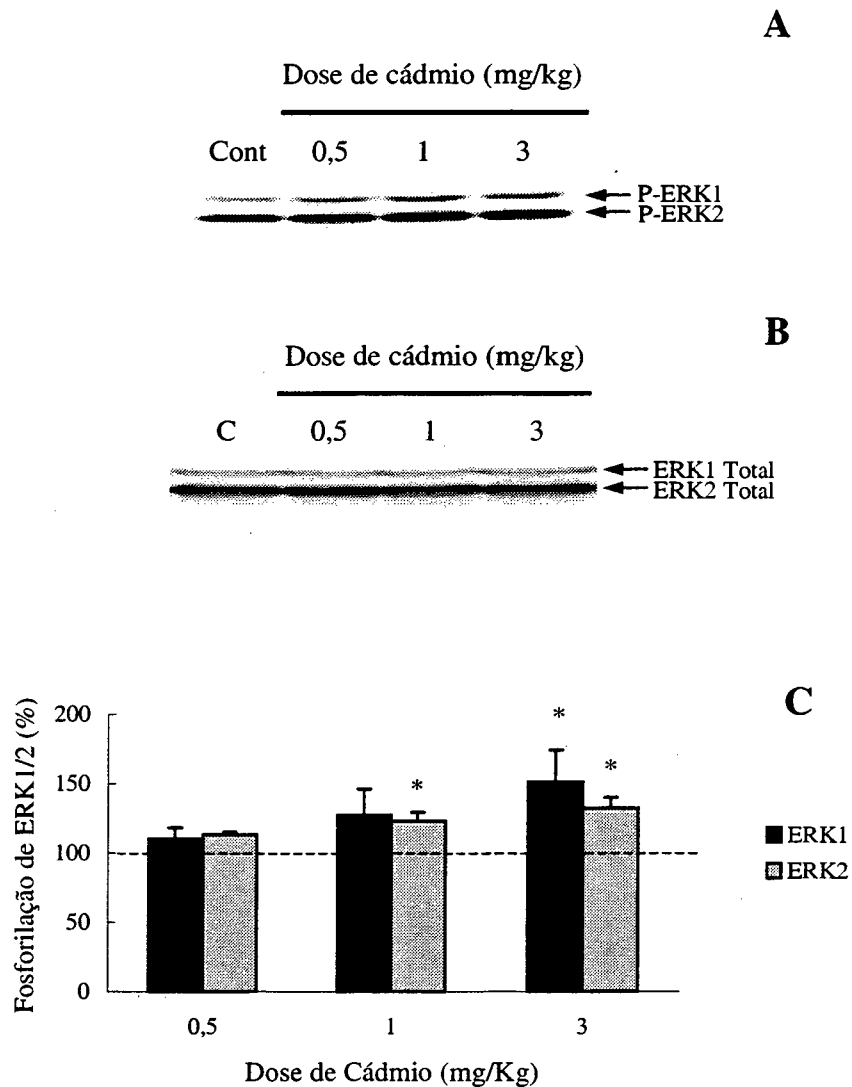


Figura 24-Efeito do cádmio sobre a fosforilação de ERK1/2 em fatias de hipocampo de ratos jovens tratados *in vivo*. (A) Imunoblotting mostrando as bandas de fosfo-ERK1/2. (B) Imunoblotting mostrando o conteúdo de ERK1/2. (C) Quantificação da fosforilação das bandas.

Ratos com 8 dias de idade foram tratados com salina (controle) ou com diferentes doses de cádmio durante 5 dias consecutivos. No 14º dia os animais foram mortos e os hipocampos retirados para análise. A fosforilação de ERK1/2 foi determinada através da densitometria dos imunoblottings. Os resultados representam a média \pm erro padrão das densidades ópticas de cada banda e são expressas como percentuais relativos ao controle (considerado 100%); $n = 8$; * $p < 0,05$ em relação ao controle.

4.3.3.2-Análise da Fosforilação de p38^{MAPK} em Fatias de Hipocampo de Ratos Jovens Tratados com Chumbo ou Cádmio in vivo

De modo semelhante à análise da fosforilação de ERK, fatias de hipocampo de ratos jovens tratados com chumbo ou cádmio foram analisadas quanto a fosforilação de p38^{MAPK}. As Figuras 25A e 26A mostram o imunoblotting dos efeitos do chumbo e do cádmio, respectivamente, sobre a fosforilação da p38^{MAPK}. A quantificação das bandas é mostrada nas figuras 25C e 26C (ver também Anexo 8), sendo que a fosforilação da p38^{MAPK} foi expressa em percentagem do controle (considerado 100%). Ambos os metais aumentaram significativamente, em relação aos controles, a fosforilação de p38^{MAPK} em todas as doses testadas (Fig. 25 e 26). Os metais não produziram alteração no imunoconteúdo da p38^{MAPK} (Fig. 25B e 26B).

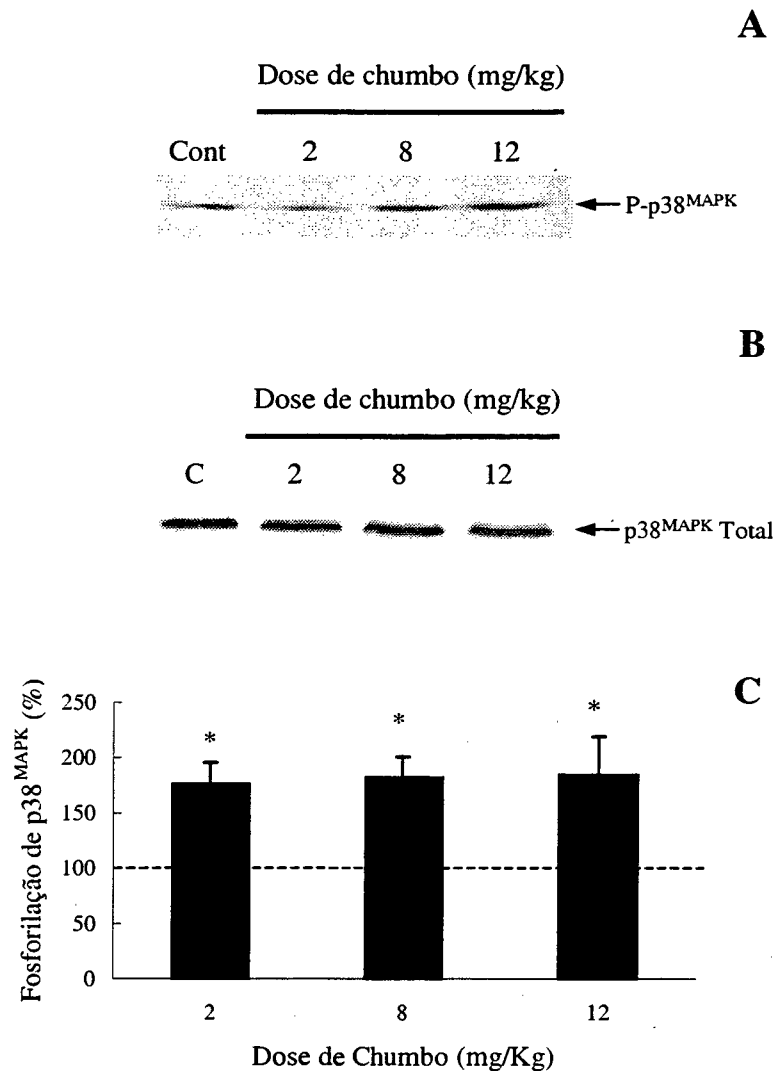


Figura 25-Efeito do chumbo sobre a fosforilação de p38^{MAPK} em fatias de hipocampo de ratos jovens tratados *in vivo*. (A) Imunoblotting mostrando as bandas de fosfo-p38^{MAPK}. (B) Imunoblotting mostrando o conteúdo de p38^{MAPK}. (C) Quantificação da fosforilação das bandas.

Ratos com 8 dias de idade foram tratados com salina (controle) e com diferentes doses de chumbo durante 5 dias consecutivos. No 14^o dia os animais foram mortos e os hipocampus retirados para análise. A fosforilação de p38^{MAPK} foi determinada através da densitometria dos imunoblottings. Os resultados representam a média \pm erro padrão das densidades ópticas de cada banda e são expressas como percentuais relativos ao controle (considerado 100%); n = 8; * p < 0,05 em relação ao controle.

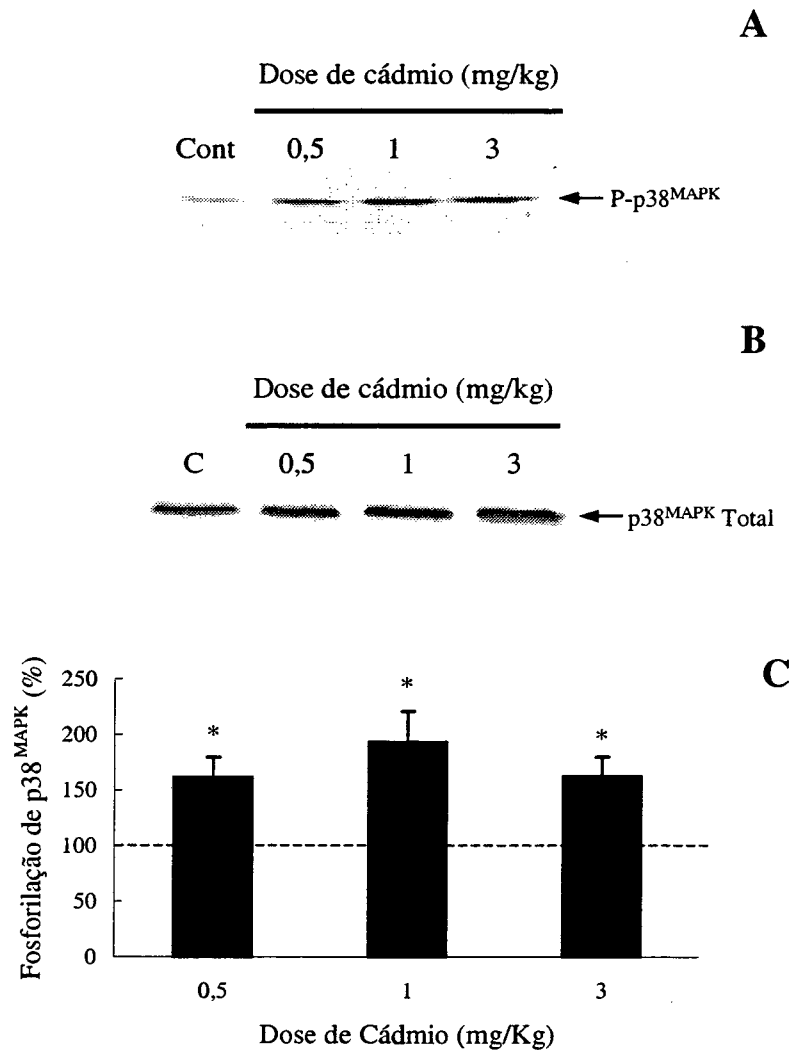


Figura 26-Efeito do cádmio sobre a fosforilação de p38^{MAPK} em fatias de hipocampo de ratos jovens tratados *in vivo*. (A) Imunoblotting mostrando as bandas de fosfo-p38^{MAPK}. (B) Imunoblotting mostrando o conteúdo de p38^{MAPK}. (C) Quantificação da fosforilação das bandas.

Ratos com 8 dias de idade foram tratados com salina (controle) e com diferentes doses de cádmio durante 5 dias consecutivos. No 14^o dia os animais foram mortos e os hipocampus retirados para análise. A fosforilação de p38^{MAPK} foi determinada através da densitometria dos imunoblottings. Os resultados representam a média \pm erro padrão das densidades ópticas de cada banda e são expressas como percentuais relativos ao controle (considerado 100%); n = 8; * p < 0,05 em relação ao controle.

4.3.4-Avaliação do Conteúdo de HSPs, PP1 e PP2A em Fatias Hipocampais

De modo semelhante às MAPKs, foram analisados no hipocampo os imunocorrelatos de Hsp27 e Hsp70 nos animais tratados *in vivo* com chumbo e cádmio (Fig. 27 e 28, respectivamente). Adicionalmente, também foram avaliados os imunocorrelatos das subunidades catalíticas de PP1 e PP2A em animais expostos ao chumbo (Fig. 29). Não foram observadas diferenças significativas no imunocorrelato das referidas proteínas nos tratamentos utilizados.

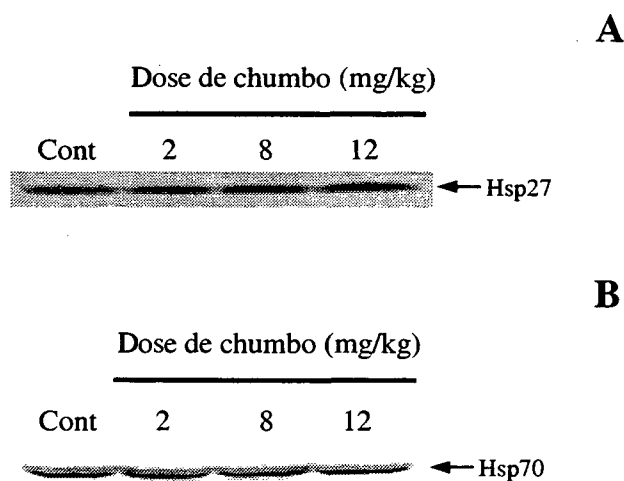


Figura 27-Conteúdo de Hsp27 (A) e Hsp70 (B) em fatias hipocampais de ratos jovens tratados *in vivo* com chumbo.

Ratos com 8 dias de idade foram tratados com salina (controle) e com diferentes doses de chumbo durante 5 dias consecutivos. No 14º dia os animais foram mortos e os hipocampus retirados para análise. As figuras A e B apresentam imunoblottings representativos dos efeitos do chumbo sobre o imunocorrelato de Hsp27 e Hsp70, respectivamente; n = 4.

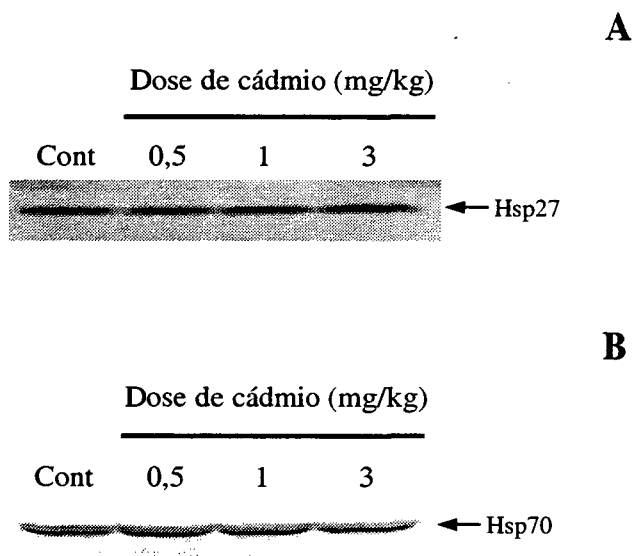


Figura 28-Conteúdo de Hsp27 (A) e Hsp70 (B) em fatias hipocâmpais de ratos jovens tratados *in vivo* com cádmio.

Ratos com 8 dias de idade foram tratados com salina (controle) e com diferentes doses de cádmio durante 5 dias consecutivos. No 14º dia os animais foram mortos e os hipocâmpos retirados para análise. As figuras A e B apresentam imunoblottings representativos dos efeitos do cádmio sobre o imunoconteúdo de Hsp27 e Hsp70, respectivamente; n = 4.

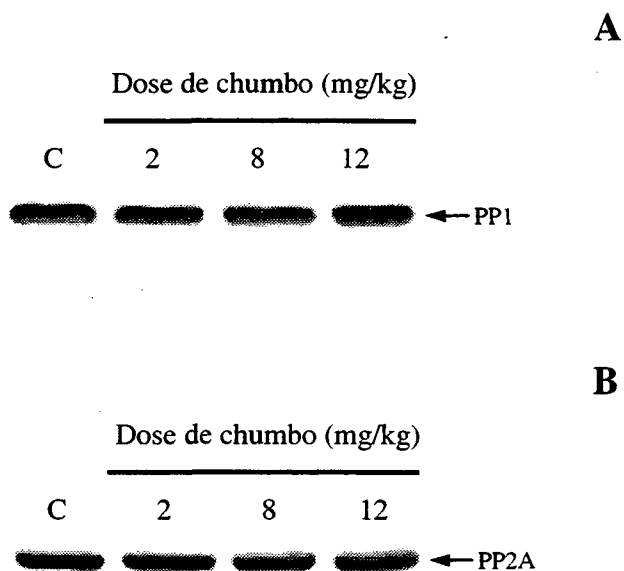


Figura 29-Conteúdo de PP1 (A) e PP2A (B) em fatias hipocâmpais de ratos jovens tratados *in vivo* com chumbo.

Ratos com 8 dias de idade foram tratados com salina (controle) e com diferentes doses de chumbo durante 5 dias consecutivos. No 14º dia os animais foram mortos e os hipocâmpos retirados para análise. As figuras A e B apresentam imunoblottings representativos dos efeitos do chumbo sobre o imunoc conteúdo da subunidade catalítica de PP1 e PP2A, respectivamente; n = 4.

5-DISCUSSÃO

Diversos estudos demonstram a ativação por metais pesados de proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs). Foi mostrada a ativação de ERK1/2 e p38^{MAPK} em linhagens de neuroblastoma pelo cádmio, resultando em mitogênese e apoptose, respectivamente (HUNG *et al.*, 1998a). De forma semelhante, em cultura de promonócitos o cádmio causou ativação de p38^{MAPK} com apoptose (GALÀN *et al.*, 2000). Recentemente, nós demonstramos em células cromafins bovinas (BACC) e em células de neuroblastoma (SH SY5Y) a ativação de p38^{MAPK} pelo chumbo, resultando na fosforilação da Hsp27 (LEAL *et al.*, 2002). Adicionalmente, em células PC12 o chumbo aumentou a taxa de crescimento de neuritos de modo dependente da ativação de ERK induzida por fator de crescimento neural (WILLIAMS *et al.*, 2000). Os resultados obtidos neste trabalho demonstram a ativação de ERK e p38^{MAPK} por chumbo e cádmio em fatias de hipocampo de ratos jovens tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

A ativação das MAPKs depende da sua fosforilação em dois sítios. Estes sítios são um resíduo de treonina e outro de tirosina, como por exemplo, Thr183 e Tyr185 da ERK e Thr180 e Tyr182 da p38^{MAPK}. Entretanto, é necessária a fosforilação em ambos os resíduos para a ativação da enzima (COBB & GOLDSMITH, 1995). Os anticorpos específicos usados nesse trabalho reconhecem somente a forma fosforilada (nos dois sítios) destas enzimas. Nos experimentos *in vitro*, o chumbo aumentou a fosforilação de ERK1 e p38^{MAPK} de forma

dependente de tempo e concentração, onde a concentração mínima de chumbo, efetiva para estimular a fosforilação de ERK1 e de p38^{MAPK} foi de 10µM e 5µM, respectivamente. (Fig. 9, 10, 13 e 14). O cádmio produziu um aumento proeminente na fosforilação de ERK1/2 em concentrações altas (100 e 200µM) (Fig. 11 e 12). No caso da p38^{MAPK} foi observado um aumento significativo em sua fosforilação pelo cádmio à partir de 100µM em incubações de 1 hora (Fig. 15) e à partir de 5µM em incubações de 3 horas (Fig. 16).

Nos hipocampos de ratos jovens expostos *in vivo* aos metais, pôde-se observar aumentos significativos no estado de fosforilação de ERK1/2 à partir 2mg/kg de chumbo e 3mg/kg de cádmio (Fig. 23, 24). Aumentos significativos na fosforilação de p38^{MAPK} foram observados à partir de 2mg/kg de chumbo e 0,5mg/kg de cádmio (Fig. 25 e 26). Estes resultados mostram que os efeitos obtidos *in vitro* também são observados quando os animais foram expostos *in vivo* aos metais.

Alguns estudos demonstram o acúmulo de chumbo no SNC de ratos jovens, em quantidades que variam de 0,10 a 2,16µg/g de tecido, após diferentes modelos e tempos de tratamento (GOULART *et al.*, 2001; MAMELI *et al.*, 2001; TROMBINI *et al.*, 2001). Adicionalmente, a idade média de 14 dias, dos ratos utilizados neste trabalho, corresponde à segunda fase de desenvolvimento rápido pós-natal do SNC. ERK e p38^{MAPK} tem papéis importantes nesta fase, desta forma, a modulação dessas enzimas de sinalização pelos metais poderia interferir no desenvolvimento do SNC.

As ERK1/2 têm sido implicadas na formação de memória e no fenômeno de formação de LTP (SWEATT, 2001). Estudos demonstram que o chumbo pode prejudicar estes fenômenos (GILBERT *et al.*, 1999). Baseado nisso nossos dados podem levantar a hipótese de que uma modulação de ERK no hipocampo por chumbo poderia, eventualmente, contribuir com alguns dos danos cognitivos observados em animais expostos ao metal. Entretanto,

estudos funcionais *in vivo* e o uso de inibidores específicos será necessário para testar esta possibilidade. Pouco se sabe até o momento sobre os papéis fisiológicos da p38^{MAPK}. Entretanto, é bem caracterizada a participação dessa enzima nos processos de morte celular programada (HUNG *et al.*, 1998a; IRYO *et al.*, 2000; IRVING *et al.*, 2000). Os aumentos de fosforilação de p38^{MAPK} observados nos experimentos *in vitro* e *in vivo*, mesmo com baixas doses de metal poderia sugerir a possibilidade de ocorrência de morte celular, entretanto isto não é respaldado pelos resultados de estudo de viabilidade. Desta forma uma possibilidade que também deve ser considerada é de que as respostas de ativação de p38^{MAPK} possam estar correlacionadas com mecanismos neuroprotetores, envolvendo, por exemplo, a fosforilação de Hsp27 (LEAL *et al.*, 2002).

Neste trabalho nós não caracterizamos o mecanismo pelo qual o chumbo e o cádmio causam modulação de ERK1/2 e de p38^{MAPK}. Entretanto, alguns mecanismos podem ser aventados.

Vários trabalhos demonstram que metais pesados produzem estresse oxidativo (FIGUEIREDO-PEREIRA *et al.*, 1998; ALMAZAN *et al.*, 2000; OLIVIERI *et al.*, 2000; JOSEPH *et al.*, 2001; STOHS *et al.*, 2001; VALVERDE *et al.*, 2001), e que esse processo poderia ser o mecanismo intermediário para a ativação de MAPKs (AIKAWA *et al.*, 1997; CLERK *et al.*, 1998; LEE & CORRY, 1998; BHAT & ZHANG, 1999). O tecido neural, especialmente na região hipocampal, é altamente sensível ao estresse oxidativo (GREENAMYRE, 1986; RÖNNBACK & HANSSON, 1992). O hipocampo é uma área importante do SNC, responsável por muitos processos cognitivos. O estresse oxidativo nessa região pode resultar em distúrbios de aprendizado, de memória e de comportamento observados em crianças após exposição crônica e em baixos níveis ao chumbo (BRESSLER & GOLDSTEIN, 1991). Entretanto, o mecanismo de ativação de MAPKs por espécies

reativas de oxigênio (ROS) permanece obscuro. Um possível mecanismo sugerido é a inativação de proteínas tirosina fosfatases por ROS (DENU & TANNER, 1998), levando à fosforilação aumentada de resíduos de tirosina nas moléculas de sinalização, que ativam as cascatas das MAPKs (SUNDARESAN *et al.*, 1995; HUANG *et al.*, 1996; RAO, 1996). No caso da ERK, esse mecanismo pode envolver a fosforilação de receptores fatores de crescimento, ou moléculas que estão “abaixo” dele, como as moléculas Src, Ras, Raf-1.

Outra possibilidade de ativação de ERK por metais poderia envolver PKC, sendo que o mecanismo pelo qual essa enzima pode ativar a ERK é via fosforilação direta em Raf-1 (KOLCH *et al.*, 1993). Adicionalmente, é bem documentada a ativação de PKC por chumbo (MARKOVAC & GOLDSTEIN, 1988; RAJANNA *et al.*, 1995; SUN *et al.*, 1999) e por cádmio (TANG & ENGER, 1993; BEYERSMANN *et al.*, 1994). Esses dados, juntamente com os resultados obtidos nesse trabalho, sugerem também um possível mecanismo de ativação das ERKs no SNC, através da fosforilação de Raf-1 pela PKC ativada por metais.

Outro possível mecanismo de ativação de MAPKs no SNC, se refere à inibição direta da atividade de proteínas tirosinas fosfatases por metais. Foi demonstrado que metais como o vanádio e o zinco podem inibir tirosina fosfatases, através de interação com resíduos de cisteína no sítio catalítico dessas enzimas (MORINVILLE *et al.*, 1998). Uma consequência dessa ação poderia ser um aumento da atividade de proteínas quinases que dependem da fosforilação sobre resíduos de tirosina (SAMET *et al.*, 1998; SAMET *et al.*, 1999). Adicionalmente, foi descrita uma proteína fosfatase denominada MKP-7, sendo caracterizada em possuir especificidade para p38^{MAPK} e JNK. Essa enzima também possui resíduo de cisteína no sítio ativo (TANOUE *et al.*, 2001), fator que pode determinar potencial alvo para metais pesados.

Nos animais tratados *in vivo* com chumbo, não foram observadas modificações no imunconteúdo das subunidades catalíticas de PP1 e de PP2A. Entretanto, apesar da falta de alteração de conteúdo de PP1 e PP2A, chumbo ou cádmio ainda poderiam modificar a atividade ou localização subcelular destas enzimas, contribuindo para um desequilíbrio fosforilação/defosforilação. Estudos da ação de metais sobre estas fosfatases não são observados na literatura.

Os metais pesados também podem causar prejuízos no metabolismo energético da célula. Foi demonstrado que o chumbo e o cádmio podem prejudicar a atividade mitocondrial em preparações neurais, provocando redução na produção de ATP, diminuição na atividade da Na⁺-K⁺-ATPase e diminuição da viabilidade celular (GMEREK *et al.*, 1981; WALTON, 1982; DUMAS *et al.*, 1985; STRUZYNSKA *et al.*, 1997; AL-NASSER, 2000). Nossos resultados demonstram que o chumbo não foi capaz de modificar a viabilidade celular em fatias hipocâmpais de ratos jovens *in vitro* (Fig. 7). Entretanto, em preparações de frações subcelulares, como os sinaptossomas, o metal causou diminuição significativa de viabilidade nos períodos de 20 a 60 minutos (Fig. 20). A resistência das fatias de hipocampo ao chumbo sugere algum efeito protetor, provavelmente realizado por astrócitos, uma vez que representam o modelo que mais se aproxima do tecido íntegro por manter as interações neurônio-glia (GONG *et al.*, 2001). O cádmio nas concentrações de 100 e 200µM provocou uma diminuição na viabilidade celular das fatias em torno de 50% (Fig. 7), sugerindo que este metal, diferente do chumbo, pode desencadear mecanismos intracelulares que levam à morte celular nas fatias. YOSHIDA (2001) demonstrou que o cádmio pode afetar diretamente as células nervosas, através de aumentos na concentração de cálcio intracelular e produção de necrose.

O efeito prejudicial do cádmio sobre a viabilidade das células, não foi atenuado submetendo as fatias a um período de recuperação de 2 horas após a exposição ao metal. Adicionalmente, o uso do inibidor de $p38^{\text{MAPK}}$, SB203580, também não modificou a diminuição da viabilidade causada pela exposição de 1 hora ao cádmio (Fig. 8). Estes resultados sugerem a acumulação do metal no interior da célula após 1 hora de incubação, produzindo assim efeito prolongado. Adicionalmente, sugere mecanismos independentes de $p38^{\text{MAPK}}$ no processo de morte celular.

O cádmio também produziu diminuição da viabilidade celular nas fatias provenientes de ratos adultos (Fig. 19), mas este efeito é significativamente menor do que o observado sobre a viabilidade celular nos animais jovens ($p < 0,05$) (Figura 7). Estas observações colaboram com a hipótese de que a glia madura pode acumular metal em forma não tóxica em sítios celulares específicos (TIFFANY-CASTIGLIONI & QIAN, 2001).

Nos hipocampus de ratos jovens expostos *in vivo* ao chumbo e cádmio, não houve alteração da viabilidade celular (Fig. 22) nem alterações no crescimento dos animais durante os tratamentos (Fig. 21). A ativação (fosforilação) da $p38^{\text{MAPK}}$ e da ERK nos tratamentos *in vivo* com os metais sem alteração dos parâmetros de viabilidade celular avaliados pela redução do MTT, não descarta a ocorrência de morte celular no modelo. É necessária uma avaliação mais específica e sensível em relação à ocorrência desse evento.

Os efeitos prejudiciais do chumbo e do cádmio sobre as mitocôndrias, resultando em diminuição da viabilidade celular, pode resultar em morte através da ativação das cascatas das vias de sinalização celular envolvidas em apoptose, como as MAPKs. Mitocôndrias são os sítios de produção de ATP e também possuem o papel de homeostase do cálcio intracelular. O efetivo tamponamento do cálcio citosólico é crítico para a sobrevivência neuronal, pois elevados níveis de cálcio podem levar à liberação de glutamato resultando em

excitotoxicidade. Adicionalmente, elevados níveis de cálcio intracelular podem também ativar MAPKs (FARNSWORTH *et al.*, 1995; LUO *et al.*, 1997; WANG *et al.*, 1997). Adicionalmente, estudos demonstraram que a CaMK pode representar um alvo potencial para a ação do chumbo via calmodulina (KERN & AUDESIRK, 1995; KERN *et al.*, 2000). Nesse sentido, possíveis aumentos dos níveis de cálcio intracelular provocados por danos mitocondriais ou a interação direta dos metais com a calmodulina pode representar um importante mecanismo de modulação de MAPKs no SNC.

O chumbo pode estimular a expressão de proteínas em culturas de astrócitos (OPANASHUK & FINKELSTEIN, 1995a), entre estas alguns subtipos de HSP, como a HO-1 (OPANASHUK & FINKELSTEIN, 1995b). Adicionalmente, o cádmio pode estimular a expressão de Hsp70 em culturas de neuroblastoma (HUNG *et al.*, 1998b). Em nosso modelo de exposição *in vitro* de fatias hipocâmpais aos metais pesados, não obtivemos alteração do conteúdo de Hsp27 e Hsp70. De forma similar, não houve alterações nos imunocontêúdos das HSPs no modelo *in vivo* (Fig. 27 e 28). Estes resultados podem significar que as proteínas não são alteradas no hipocampo pelos metais. Por outro lado, não pode ser descartado que nos tratamentos *in vitro*, pode ter sido utilizado um tempo de incubação relativamente curto para a detecção de aumento da síntese de proteínas. No caso do modelo de exposição *in vivo*, as alterações no conteúdo dessas HSPs poderiam ocorrer em outros tempos de exposição que não foram analisados em nosso protocolo. Entretanto, OPANASHUK *et al* (1995b) não observaram modificações no imunocontêúdo de Hsp27 e Hsp70 em astrócitos em cultura expostos ao chumbo, sendo aumentado apenas o conteúdo de HO-1.

Embora os efeitos tóxicos dos metais pesados sejam bem reconhecidos, os mecanismos moleculares responsáveis ainda permanecem obscuros. Os resultados obtidos aqui mostram de forma inédita a ação do chumbo na modulação de algumas MAPKs no

hipocampo, como as ERK1/2 e p38^{MAPK}. Além disso, sugere um papel neurotóxico para o cádmio.

CONCLUSÕES

Os resultados mostraram que o chumbo, nos experimentos *in vitro*, aumentou a fosforilação de ERK1 a partir de 10 μ M e aumentou a fosforilação de p38^{MAPK} a partir de 5 μ M, no período de 3 horas de incubação. Nas mesmas condições, todas as concentrações de cádmio aumentaram a fosforilação de p38^{MAPK}. Entretanto, somente as maiores concentrações do metal (100-200 μ M) causaram aumento significativo na fosforilação de ERK1/2.

Nas avaliações de viabilidade celular, não foram observados efeitos dos tratamentos com o chumbo em fatias de hipocampo. Entretanto, em frações sinaptossomais o metal produziu diminuição significativa da viabilidade nas concentrações mais altas (50-100 μ M). O cádmio nas concentrações mais elevadas (100-200 μ M), diminuiu significativamente a viabilidade celular em fatias expostas *in vitro* ao metal.

Em fatias de hipocampo de ratos tratados *in vivo*, o chumbo causou um aumento de fosforilação de ERK1/2 e p38^{MAPK} em todas as doses testadas. O cádmio também aumentou a fosforilação de p38^{MAPK} em todas as doses, mas aumentou a fosforilação de ERK1/2 somente na dose mais alta, de 3mg/kg. A viabilidade celular analisada após a exposição ao chumbo e ao cádmio, *in vivo*, não foi modificada.

O conteúdo de Hsp27 e Hsp70 não foi modificado, tanto nos tratamentos *in vitro*, quanto nos tratamentos *in vivo* com os metais.

Em conclusão, os resultados obtidos mostram de forma inédita no hipocampo a modulação de ERK e de p38^{MAPK} pelo chumbo e pelo cádmio em tratamentos *in vitro* e *in vivo*.

PERSPECTIVAS

O presente trabalho abriu portas para novas pesquisas e levantou algumas perguntas, que são apresentadas como perspectivas futuras:

- Avaliação do tipo de morte celular ocorrida nas fatias hipocampais;
- Determinar possíveis alterações na fosforilação de Hsp27 no hipocampo em resposta ao chumbo e cádmio, conforme já observado previamente em células cromafins bovinas (LEAL *et al.*, 2002);
- Avaliar a capacidade dos metais em produzir estresse oxidativo no modelo de fatias, e se este processo está envolvido como um elemento intermediário na ativação de proteínas de estresse (MAPK);
- Avaliação do envolvimento de outras cascatas de sinalização envolvidas nas respostas de estresse, como a via da proteína quinase B (PKB/Akt), no modelo de fatias de hipocampo devido às demonstrações da modulação dessa quinase pelo cádmio em culturas celulares (KONISHI *et al.*, 1997);
- Determinar o efeito dos metais pesados sobre a atividade de proteínas fosfatases;
- Determinar o acúmulo de chumbo e cádmio no hipocampo após administração intra-peritoneal;

- Avaliação dos efeitos da inibição de MEK pelo PD98059 sobre a viabilidade celular

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABU-HAYYEH, S.; SIAN, M.; JONES, K.G.; MANUAL, A.; POWELL, J.T. Cadmium accumulation in aortas of smokers. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**. v.21, n.5, p.863-867, 2001.
- ACAN, N.L. & TEZCAN, E.F. Inhibition kinetics of sheep brain glutathione reductase by cadmium ion. **Biochemical and Molecular Medicine**. v.54, p.33-37, 1995.
- AIKAWA, R.; KOMURO, I.; YAMAZAKI, T.; ZOU, Y.; KUDOH, S.; TANAKA, M.; SHIOJIMA, I.; HIROI, Y.; YAZAKI, Y. Oxidative stress activates extracellular signal-regulated kinases through Src and Ras in cultured cardiac myocytes of neonatal rats. **Journal of Clinical Investigation**. v.100, p.1813-1821, 1997.
- ALMAZAN, G.; LIU, H.N.; KHORCHID, A.; SUNDARARAJAN, S.; MARTINEZ-BERMUDEZ, A.K.; CHEMTOB, S. Exposure of developing oligodendrocytes to cadmium causes HSP72 induction, free radical generation, reduction in glutathione levels, and cell death. **Free Radicals in Biology and Medicine**. v.29, n.9, p.858-869, 2000.
- AL-NASSER, I.A. Cadmium hepatotoxicity and alterations of the mitochondrial function. **Clinical Toxicology**. v.38, n.4, p.407-413, 2000.
- ALONSO, E.; CAMBRA, K.; MARTINEZ, T. Lead and cadmium exposure from contaminated soil among residents of a farm area near an industrial site. **Archives of Environmental Health**. v.56, n.3, p.278-282, 2001.
- BALDO, B.A. Protein blotting: research, applications and its place in protein separation methodology In: **Advances in Electrophoresis**, ed. by A. Chranbach, M.J. Dunn and B.J. Radola, 1994, v.7, p.407-478, VCH.
- BELLONI-OLIVI, L.; ANNADATA, M.; GOLDSTEIN, G.W.; BRESSLER, J.P. Phosphorylation of membrane proteins in erythrocytes treated with lead. **Biochemical Journal**. v.315, p.401-406, 1996.
- BEYERSMANN, D.; BLOCK, C.; MALVIYA, A.N. Effects of cadmium on nuclear protein kinase C. **Environmental Health Perspectives**. v.102, p.177-180, 1994.

- BHAT, N.R. & ZHANG, P. Hydrogen peroxide activation of multiple mitogen-activated protein kinases in an oligodendrocyte cell line: role of extracellular signal-regulated kinase in hydrogen peroxide-induced cell death. **Journal of Neurochemistry**. v.72, p.112-119, 1999.
- BLANUSA, M. & JURESA, D. Lead, cadmium, and mercury dietary intake in Croatia. **Arh. Hig. Rada Toksikol.** v.52, n.2. p.229-237, 2001.
- BLUM, S.; MORRE, A.N.; ADAMS, F.; DASH, P.K. A mitogen-activated protein kinase cascade in the CA1/CA2 subfield of the dorsal hippocampus is essential for long-term spatial memory. **The Journal of Neuroscience**. v.19, n.9, p.3535-3544, 1999.
- BOBROVSKAIA, L.; ODELL, A.; LEAL, R.B.; DUNKLEY, P.R. Tyrosine hydroxylase phosphorylation in bovine adrenal chromaffin cells: the role of MAPKs after angiotensin II stimulation. **Journal of Neurochemistry**. v.78, p.490-498, 2001.
- BRESSLER, J.P. & GOLDSTEIN, G.W. Mechanisms of lead neurotoxicity. **Biochemical Pharmacology**. v.41, p.479-484, 1991.
- BRESSLER, J.; KIM, K.; CHAKRABORTI, T.; GOLDSTEIN, G. Molecular mechanisms of lead neurotoxicity. **Neurochemical Research**. v.24, n.4, p.595-600, 1999.
- BRESSLER, J.P.; BELLONI-OLIVI, L.; FORMAN, S.; GOLDSTEIN, G.W. Distinct mechanisms of neurotransmitter release from PC12 cells exposed to lead. **Journal of Neuroscience Research**. v.46, p.678-685, 1996.
- BRUCE, A.J.; BOLING, W.; KINDY, M.S. Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors. **Nature Medicine**. v.2, p.788-794, 1996.
- BUNN, S.J.; SIM, A.T.R.; HERD, L.M.; AUSTIN, L.M.; DUNKLEY, P.R. Tyrosine hydroxylase phosphorylation in bovine adrenal chromaffin cells: The role of intracellular calcium in the histamine H1 stimulated phosphorylation of Ser⁸, Ser¹⁹, Ser³¹ and Ser⁴⁰. **Journal of Neurochemistry**. v.64, p.1370-1378, 1995.
- CARBONI, L.; TACCONI, S.; CARLETTI, R.; BETTINI, E.; FERRAGUTI, F. Localization of the messenger RNA for the c-Jun NH₂-terminal kinase kinase in the adult and developing rat brain: an in situ hybridisation study. **Neuroscience**. v.80, p.147-160, 1997.
- CHANG, L. & KARIN, M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. **Nature**. v.410, n.1, p.37-40, 2001.
- CLERK, A.; FULLER, S.J.; MICHAEL, A.; SUGDEN, P.H. Stimulation of "stress-regulated" mitogen-activated protein kinase (stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinases and p38-mitogen-activated protein kinases) in perfused rat hearts by oxidative and other stresses. **The Journal of Biological Chemistry**. v.273, n.13, p.7228-7234, 1998.
- COBB, M.H. & GOLDSMITH, E.J. How the Map kinases are regulated. **The Journal of Biological Chemistry**. v.270, n.25, p.14843-14846, 1995.

- COLLINS, E. & SIM, A.T.R. Regulation of neuronal PP1 and PP2A during development. **Methods in Molecular Biology**. v.93, p.79-102, 1998.
- DAVIS, S.; VANHOUTTE, P.; PAGÈS, C.; CABOCHE, J.; LAROCHE, S. The MAPK/EKR cascade targets both Elk-1 and cAMP response element-binding protein to control long-term potentiation-dependent gene expression in the dentate gyrus *in vivo*. **The Journal of Neuroscience**. v.20, n.12, p.4563-4572, 2000.
- DEMOOR, J.M. & KOROPATNICK, D.J. Metals and cellular signalling in mammalian cells. **Cellular and Molecular Biology**. v.46, n.2, p.367-381, 2000.
- DENU, J.M. & TANNER, K.G. Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediated and implications for redox regulation. **Biochemistry**. v.37, p.5633-5642, 1998.
- DUMAS, P.; GUELDRY, D.; LOIREAU, A.; CHOMARD, A.M.; AUTISSIER, N. Effects of lead poisoning on properties of brain mitochondria in young rats. **Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de ses Filiales**. v.179, n.2, p.175-183, 1985.
- DUNKLEY, P.R.; JARVIE, P.E.; HEATH, J.W.; KIDD, G.J.; ROSTAS, J.A.P. A rapid method for isolation of synaptosomes on Percoll gradients. **Brain Research**. v.372, p.115-129, 1986.
- ELINDER, C.G. Biological monitoring of cadmium. In: **Biological monitoring of exposure to chemical metals**. New York: John Wiley and Sons, 1991. p.197-207
- FALNOGA, I.; TUSEK-ZNIDARIC, M.; HORVAL, M.; STEGNAR, P. Mercury, selenium, and cadmium in human autopsy samples from Dirija residents and mercury mine workers. **Environmental Research**. v.84, n.3, 211-208, 2000.
- FARNSWORTH, C.L.; FRESHNEY, N.W.; ROSEN, L.B.; GHOSH, A.; GREENBERG, M.E.; FEIG, L.A. Calcium activation of Ras mediated by exchange factor Ras-GRF. **Nature**. v.376, p.524-527, 1995.
- FIGUEIREDO-PEREIRA, M.E.; YAKUSHIN, S.; COHEN, G. Disruption of the intracellular sulfhydryl homeostasis by cadmium-induced oxidative stress leads to protein thiolation and ubiquitination in neuronal cells. **The Journal of Biological Chemistry**. v.273, n.21, p.12703-12709, 1998.
- FINKELSTEIN, Y.; MARKOWITZ, M.E.; ROSEN, J.F. Low-level lead-induced neurotoxicity in children: an update on central nervous system effects. **Brain Research Reviews**. v.27, p.168-176, 1998.
- GABBIANI, G.; BADONNEL, M.C.; MATHEWSON, S.M.; RYAN, G.B. Acute cadmium intoxication. Early selective lesions of endothelial clefts. **Laboratory Investigation**. v.30, p.686-695, 1974.

- GALÀN, A.; GARCÍA-BERMEJO, M.L.; TROYANO, A.; VILABOA, N.E.; BLAS, E.; KAZANIETZ, M.G.; ALLER, P. Stimulation of p38 mitogen-activated protein kinase is an early regulatory event for the cadmium-induced apoptosis in human promonocytic cells. **The Journal of Biological Chemistry**. v.275, n.15, p.11418-11424, 2000.
- GEBHART, E. & ROSSMAN, T.G. **Metals and their compounds in the environmental**. New York: VHC Publishers, Inc., 1991. p.617-640
- GILBERT, M.E.; MACK, C.M.; LASLEY, S.M. The influence of developmental period of lead exposure on long-term potentiation in the adult rat dentate gyrus *in vivo*. **Neurotoxicology**. v.20, n.1, p.57-70, 1999.
- GMERER, D.E.; McCAFFERTY, M.R.; O'NEILL, K.J.; MELAMED, B.R.; O'NEILL, J.J. Effect of inorganic lead on rat brain mitochondrial respiration and energy production. **Journal of Neurochemistry**. v.36, n.3, p.1109-1113, 1981.
- GONG, C.; LIDSKY, T.; WEGIEL, J.; GRUNDKE-IQBAL, I.; IQBAL, K. Metabolically active rat brain slices as a model to study the regulation of protein phosphorylation in mammalian brain. **Brain Research Protocols**. v.6, p.134-140, 2001.
- GOULART, E.C.; GIACOMELLI, M.B.; PEREIRA, C.A.T.; GARCIA, R.C.; RODRIGUES, A.L.S. Effects of Lead and/or zinc exposure during the second stage of rapid postnatal brain growth on delta-aminolevulinic acid dehydratase and negative geotaxis of sucking rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.43, n.6, p.785-790, 2001.
- GREENAMYRE, J.T. The role of glutamate in neurotransmission and in neurological disease. **Archives of Neurology**. v.43, p.1058-1063, 1986.
- GREENGARD, P. The neurobiology of slow synaptic transmission. **Science**. v.294, p.1024-1030, 2001.
- GU, Z.; JIANG, Q.; ZHANG, G. Extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation in hippocampus after cerebral ischemia may not interfere with postischemic cell death. **Brain Research**. v.901, p.79-84, 2001.
- HAN, J.; LEE, J.D.; BIBBS, L.; ULEVITCH, R.J. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. **Science**. v.265, p.808-811, 1994.
- HENSLEY, K.; ROBINSON, K.A.; PYE, Q.N.; FLOYD, R.A.; CHENG, I.; GARLAND, W.A.; IRWIN, I. CPI-1189 inhibits interleukin 1 β -induced p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylation: an explanation for its neuroprotective properties? **Neuroscience Letters**. v.281, p.179-182, 2000.
- HERBA, E.; POJDA-WILCZEK, D.; POJDA, S.M.; BRUS, R.; PLECH, A. The effect of prenatal exposure to cadmium on flash visual evoked potentials in rat offspring before and after injection of norepinephrine into the lateral brain ventricle. **Klin Oczna**. v.102, n.4, p.233-236, 2000.

- HERDEGEN, T.; CLARET, F.X.; KALLUNKI, T.; MARTIN-VILLALBA, A.; WINTER, C.; HUNTER, T.; KARIN, M. Lasting N-terminal phosphorylation of c-Jun and activation of JNK/SAPK kinases neuronal injury. **The Journal of Neuroscience**. v.18, p.5124-5135, 1998.
- HOLZ, R.W. & FISCHER, S.K. Synaptic transmission and cellular signalling: an overview. In: **Basic Neurochemistry**. Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia, 1999.
- HUANG, R.P.; WU, J.X.; FAN, Y.; ADAMSON, E.D. UV activates growth factor receptors via reactive oxygen intermediates. **Journal of Cell Biology**. v.133, p.211-220, 1996.
- HUNG, J.; CHENG, T.; CHANG, M.D.; CHEN, K.; HUANG, H.; LAI, Y. Involvement of heat shock elements and basal transcription elements in the differential induction of the 70-kDa heat shock protein and its cognate by cadmium chloride in 9L brain tumour cells. **Journal of Cellular Biochemistry**. v.71, p.21-35, 1998b.
- HUNG, J.; CHENG, T.; LAI, Y.; CHANG, M.D. Differential activation of p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated protein kinase confers cadmium-induced HSP70 expression in 9L rat brain tumor cells. **The Journal of Biological Chemistry**. v.273, n.48, p.31924-31931, 1998a.
- HUNTER, T. & SEFTON, B.M. Protein phosphorylation. Part A. **Methods in Enzymology**. v.200, 1991.
- HUNTER, T. Protein kinases and phosphatases: the Yin and Yang of protein phosphorylation and signalling. **Cell**. v.80, p.225-236, 1995.
- IRVING, E.A.; BARONE, F.C.; REITH, A.D.; HADINGHAM, S.J.; PARSONS, A.A. Differential activation of MAPK/ERK and p38/SAPK in neurones and glia following focal cerebral ischaemia in the rat. **Molecular Brain Research**. v.77, p.65-75, 2000.
- IRYO, Y.; MATSUOKA, M.; WISPRIYONO, B.; SUGIURA, T.; IGISU, H. Involvement of the extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) pathway in the induction of apoptosis by cadmium chloride in CCRF-CEM cells. **Biochemical Pharmacology**. v.60, n.12, p.1875-1882, 2000.
- ISHIHARA, T.; KOBAYASHI, E.; OKUDO, Y.; SUWAZONO, Y.; KIDO, T.; NISHIJYO, M.; NAKAGAWA, H. Association between cadmium concentration in rice and mortality in the Jinzu River, Japan. **Toxicology**. v.163, n.1, p.23-28, 2001.
- JARUP, L.; BERGLUND, M.; ELINDER, C.; NORDBERGE, G.; VAHTER, M. Health effect of cadmium exposure. A review of the literature and a risk estimated. **Scandinavian Journal of Work Environment Health**. v.24, n.1, p.1-51, 1998.
- JOSEPH, P.; MUCHNOK, T.K.; KLISHIS, M.L.; ROBERTS, J.R.; ANTONINI, J.M.; WHONG, W.Z.; ONG, T. Cadmium-induced cell transformation and tumorigenesis are associated with transcriptional activation of c-fos, c-jun, and c-myc proto-oncogenes: role of cellular calcium and reactive oxygen species. **Toxicological Sciences**. v.61, n.2, p.295-303, 2001.

- KAWASAKI, H.; MOROOKA, T.; SHIMOHAMA, S.; KIMURA, J.; HIRANO, T.; GOTOH, Y.; NISHIDA, E. Activation and involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in glutamate-induced apoptosis in rat cerebellar granule cells. **Journal of Biological Chemistry**. v.272, p.18518-18521, 1997.
- KAWASAKI, H.; FUJII, H.; GOTOH, Y.; MOROOKA, T.; SHIMOHAMA, S.; NISHIDA, E.; HIRANO, T. Requirement for mitogen-activated protein kinases in cerebellar long-term depression. **The Journal of Biological Chemistry**. v.274, n.19, p.13498-13502, 1999.
- KERN, M. & AUDESIRK, G. Inorganic lead may inhibit neurite development in cultured rat hippocampal neurons through hyperphosphorylation. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v.134, p.111-123, 1995.
- KERN, M.; WISNIEWSKI, M.; CABELL, L.; AUDESIRK, G. Inorganic lead and calcium interact positively in activation of calmodulin. **Neurotoxicology**. v.21, n.3, p.353-363, 2000.
- KISS, T. & OSIPENKO, O. Toxic effects of heavy metals on ionic channels. **Pharmacological Reviews**. v.46, n.3, p.245-267, 1994.
- KOLCH, W.; HEIDECKER, G.; KOCHS, G.; HUMMEL, R.; VAHIDI, H.; MISCHAK, H.; FINKENZELLER, G.; MARMÉ, D.; RAPP, U.R. Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation. **Nature**. v.364, n.6434, p.249-252, 1993.
- KONISHI, H.; MATSUZAKI, H.; TANAKA, M.; TAKEMURA, Y.; KURODA, S.; ONO, Y.; KIKKAWA, U. Activation of protein kinase B (Akt/RAC-protein kinase) by cellular stress and its association with heat shock protein Hsp27. **FEBS Letters**. v.410, p.493-498, 1997.
- KORNHAUSER, J.M. & GREENBERG, M.E. A kinase to remember: dual roles for MAP kinase in long-term memory. **Neuron**. v.18, p.839-842, 1997.
- KUAN, C.Y.; YANG, D.D.; ROY, D.R.S.; DAVIS, R.J.; RAKIC, P.; FLAVELL, R.A. The JNK1 and JNK2 protein kinases regulate regional-specific apoptosis during early brain development. **Neuron**. v.22, p.667-676, 1999.
- KYRIAKIS, J.M.; AVRUCH, J. Sounding the alarm: protein kinase cascades activated by stress and inflammation. **The Journal of Biological Chemistry**. v.271, p.24313-24316, 1996.
- LAU, L.F. & HUGANIR, R.L. Tyrosine phosphorylation. In: **Basic Neurochemistry**. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1999, p. 497-522.
- LEAL, R.B.; CORDOVA, F.M.; LYNN, H.; BOBROVSKAYA, L.; DUNKLEY, P.R. Lead-stimulate p38^{MAPK}-dependent Hsp27 phosphorylation. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v.178, p.44-51, 2002.

- LEE, S.A.; PARK, J.K.; KANG, E.K.; BAE, H.R.; BAE, K.W.; PARK, H.T. Calmodulin-dependent activation of p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases contributes to c-fos expression by calcium in PC12 cells: modulation by oxide nitric. **Molecular Brain Research**. v.75, p.16-24, 2000.
- LEE, Y.J. & CORRY, P.M. Metabolic oxidative stress-induced *HSP70* gene expression is mediated through SAPK pathway. **The Journal of Biological Chemistry**. v.273, n.45, p.29857-29863, 1998.
- LINDEN, A.; ANDERSSON, K.; OSKARSSON, A. Cadmium in organic and conventional pig production. **Arch Environ Contam Toxicology**. v.40, n.3, p.425-431, 2001.
- LIU, Y.; PETERSON, D.A.; KIMURA, H. SCHUBERT, D. Mechanism of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. **Journal of Neurochemistry**. v.69, p.581-593, 1997.
- LIU, J.; FUKUNAGA, K.; YAMAMOTO, H.; NISHI, K.; MIYAMOTO, E. Differential roles of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II and mitogen-activated protein kinase activation in hippocampal long-term potentiation. **The Journal of Neuroscience**. v.19, n.19, p.8292-8299, 1999.
- LUO, Y.; BOND, J.D.; INGRAM, V.M. Compromised mitochondrial function leads to increased cytosolic calcium and to activation of MAP kinases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.94, p.9705-9710, 1997.
- MARKOVAC, J. & GOLDSTEIN, G.W. Picomolar concentrations of lead stimulate brain protein kinase C. **Nature**. v.334, p.71-73, 1988.
- MARTIN-BLANCO, E. p38 MAPK signalling cascades: ancient roles and new functions. **BioEssays**. v.22, p.637-645, 2000.
- MAMELI, O.; CARIA, M.A.; MELIS, F.; SOLINAS, A.; TAVERA, C.; IBBA, A.; TOCCO, M.; FLORE, C.; SANNA RANDACCIO, F. Neurotoxic effect of lead at low concentrations. **Brain Research Bulletin**. v.55, n.2, p.269-275, 2001.
- MATSUOKA, M.; WISPRIYONO, B.; IRYO, Y.; IGISU, H. Mercury chloride activates c-Jun N-terminal kinase and induces c-Jun expression in LLC-PK1 cells. **Toxicological Sciences**. v.53, n.2, p.361-368, 2000.
- MAZZOLINI, M.; TRAVERSO, S.; MARCHETTI, C. Multiple pathways of Pb^{2+} permeation in rat cerebellar granule neurones. **Journal of Neurochemistry**. v.79, p.407-416, 2001.
- MIELKE, K. & HERDEGEN, T. JNK and p38 stresskinases – degenerative effectors of signal-transduction-cascades in the nervous system. **Progress in Neurobiology**. v.61, p.45-60, 2000.
- MIELKE, K.; BRECHT, S.; DORST, A.; HERDEGEN, T. Activation of JNK and p38 stress kinases, c-Jun phosphorylation and c-Jun/AP-1 DNA binding activity following kainic acid induced seizures. **Neuroscience**. v.91, p.471-483, 1999.

- MIELKE, K.; DAMM, A.; HERDEGEN, T. Selective expression of JNK isoforms and stress-specific JNK activity in different neural cell lines. **Molecular Brain Research**. v.75, n.1, p.128-137, 2000.
- MILLER, L. & QURESHI, M.A. Heat-shock protein synthesis in chicken macrophages: influence of *in vivo* and *in vitro* heat shock, lead acetate and lipopolysaccharide. **Poultry Science**. v.71, p.988-998, 1992.
- MINAMI, A.; TAKEDA, A.; NISHIBATA, D.; TAKEFUTA, S.; OKU, N. Cadmium toxicity in synaptic neurotransmission in the rat. **Brain Research**. v.894, n.2, p.336-339, 2001.
- MORINVILLE, K.; MAYSINGER, D.; SHAVER, A. From vanadis to atropis: Vanadium compounds as pharmacological tools in cell death signalling. **TIPS**. v.19, p.452-460, 1998.
- MURAKAMI, K.; FENG, G.; CHEN, S.G. Inhibition of brain protein kinase C subtypes by lead. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v.64, p.757-761, 1993.
- NAGATA, K.; IZAWA, I.; INAGAKI, M. A decade of site- and phosphorylation state-specific antibodies: recent advances in studies of spatiotemporal protein phosphorylation. **Genes Cells**. v.6, n.8, p.653-654, 2001.
- NESTLER, E.J. & GREENGARD, P. **Protein phosphorylation in the nervous system**. New York: Wiley, 1984.
- NESTLER, E.J. & GREENGARD, P. Serine and threonine phosphorylation. In: **Basic Neurochemistry**, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1999, p. 472-495.
- NG, D.C.H. & BOGOYEVITCH, M.A. The mechanism of heat shock activation of ERK mitogen-activated protein kinases in the interleukin 3-dependent ProB cell. **The Journal of Biological Chemistry**. v.275, n.52, p.40856-40866, 2000.
- NICHOLSON, D.W. & THORNBERRY, N.A. Caspases: killer proteases. **Trends in Biological Sciences**. v.22, p.299-306, 1997.
- NOLAN, C.V. & SHAIKH, Z.A. The vascular endothelium as a target tissue in acute cadmium toxicity. **Life Sciences**. v.39, p.1403-1409, 1986.
- O'CALLAGHAN, J.P.A. A potential role for the altered protein phosphorylation in the mediation of developmental neurotoxicity. **Neurotoxicology**. v.15, p.29-40, 1994.
- OHTSUKA, K. & SUZUKI, T. Roles of molecular chaperones in the nervous system. **Brain Research Bulletin**. v.53, n.2, p.141-146, 2000.
- OKADA, I.A.; SAKUMA, A.M.; MAIO, F.D.; DOVIDAUSKAS, S.; ZENEBON, O. Evaluation of lead and cadmium levels in milk due to environmental contamination in the Paraíba Valley region of Southeastern Brazil. **Revista de Saúde Pública**. v.31, n.2, p.140-143, 1997.

- OLIVIERI, G.; BRACK, C.; MÜLLER-SPAHN, F.; STÄHELIN, H.B.; HERRMANN, M.; RENARD, P.; BROCKHAUS, M.; HOCK, C. Mercury induces cell cytotoxicity and oxidative stress and increases β -amyloid secretion and Tau phosphorylation in SHSY5Y neuroblastoma cells. **Journal of Neurochemistry**. v.74, p.231-236, 2000.
- OPANASHUK, L.A. & FINKELSTEIN, J.N. Induction of newly synthesised proteins in astroglial cells exposed to lead. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v.131, p.21-30, 1995b.
- OPANASHUK, L.A. & FINKELSTEIN, J.N. Relationship of lead-induced proteins to stress response proteins in astroglial cells. **Journal of Neuroscience Research**. v.42, p.623-632, 1995a.
- ORBAN, P.C.; CHAPMAN, P.F.; BRAMBILLA, R. Is the Ras-MAPK signalling pathway necessary for long-term memory formation? **Trends Neuroscience**. v.22, n.1, p.38-44, 1999.
- PAWSON, T. & SCOTT, J. Signalling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. **Science**. v.278, p.2075-2080, 1997.
- PEARSON, C.A. & PROZIALECK, W.C. E-Cadherin, beta-Catenin and cadmium carcinogenesis. **Med. Hypotheses**. v.56, n.5, p.573-581, 2001.
- PETERSON, G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.*, which is more generally applicable. **Analytical Biochemistry**. v.83, p.346-356, 1977.
- PHELAN, P. & GORDON-WEEKS, P.R. Isolation of synaptosomes, growth cones, and their subcellular compounds. In: **Neurochemistry. A Practical Approach**. ed. by Turner, A.J. & Bachecard, H.S., 1997, 2nd Ed., Oxford University Press.
- PORTO, M.L. **Environmental evaluation of Tubarão River, SC, through analysis of heavy metals in water, sediment and plants**. MSc. Thesis of the Center of Ecology – UFRGS. 1989.
- QIAN, Y.; HARRIS, E.D.; ZHENG, Y.; TIFFANY-CASTIGLIONI, E. Lead targets GRP78, a molecular chaperone, in C6 rat glioma cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v.163, p.260-266, 2000.
- RADLOFF, M.; DELLING, M.; MARTI, T.; GERCKEN, G. HSP27 phosphorylation is induced in alveolar macrophages exposed to CdO-Coated silica particles. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v.248, p.219-222, 1998.
- RAINGEAUD, J.; GUPTA, S.; ROGERS, J.; DICKENS, M.; HAN, J.; ULEVITCH, R.J.; DAVIS, R.J. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. **Journal of Biological Chemistry**. v.270, p.7420-7426, 1995.
- RAJANNA, B.; CHETTY, C.S.; RAJANNA, S.; HALL, E.; FAIL, S.; YALLAPRAGADA, P.R. Modulation of protein kinase C by heavy metals. **Toxicology Letters**. v.81 p.197-203, 1995.

- RAMESH, G.T.; MANNA, S.K.; AGGARWAL, B.B.; JADHAV, A.L. Lead activates nuclear transcription factor- κ B, activator protein-1, and amino-terminal c-Jun kinase in pheochromocytoma cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v.155, p.280-286, 1999.
- RAO, G.N. Hydrogen peroxide induces complex formation of SHC-Grb2-SOS with receptor tyrosine kinase and activates Ras and extracellular signal-regulated protein kinases. **Oncogene**. v.13, p.713-719, 1996.
- ROBINSON, M.J. & COBB, M.H. Mitogen-activated protein kinase pathways. **Current Opinion in Cell Biology**. v.9, p.180-186, 1997.
- ROCHA, J.B.T.; PEREIRA, M.E.; EMANUELLI, T.; CHRISTOFARI, R.S.; SOUZA, D.O. Effect of treatment with mercury chloride and lead acetate during the second stage of rapid postnatal brain growth on δ -aminolevulinic acid dehydratase activity in brain, liver, kidney and blood of suckling rats. **Toxicology**. v.100, p.27-37, 1995.
- RODNIGHT, R.; ZAMANI, R.; TWEEDALE, A. An investigation of experimental conditions for studying protein phosphorylation in micro-slices of rat by two-dimensional electrophoresis. **Journal of Neuroscience Methods**. v.24, p.27-38, 1988.
- RODNIGHT, R. & LEAL, R. Regional variations in protein phosphorylation activity in rat brain studied in microsllices labelled with [32 P]phosphate. **Journal of Molecular Neuroscience**. v.2, p.115-122, 1990.
- RODRIGUES, A.L.S.; ROCHA, J.B.T.; MELLO, C.F.; SOUZA, D.O. Effect of perinatal lead exposure on rat behaviour in open-field and two-way avoidance tasks. **Pharmacology & Toxicology**. v.79, p.150-156, 1996.
- RODRIGUES, A.L.S.; REGNER, A.; RUBIN, M.A.; SOUZA, D.O. Effects of lead on adenylate cyclase activity in rat cerebral cortex. **Neurochemical Research**. v.24, n.8, p.1039-1044, 1999.
- ROGALLA, T.; EHRNSPERGER, M.; PREVILLÉ, X.; KOTLYAROV, A.; LUTSCH, G.; DUCASSE, C.; PAUL, C.; WIESKE, M.; ARRIGO, A.P.; BUCHNERS, J.; GAESTEL, M. Regulation of Hsp27 oligomerization, chaperone function, and protective activity against oxidative stress/tumor necrosis factor α by phosphorylation. **The Journal of Biological Chemistry**. v.274, p.18947-18956, 1999.
- RÖNNBACK, L. & HANSSON, E. Chronic encephalopathies induced by mercury or lead: aspects of underlying cellular and molecular mechanisms. **British Journal of Industrial Medicine**. v.49, p.233-240, 1992.
- ROSSI, A.; MANZO, L.; ORRENIUS, S.; VAHTER, M.; NICOTERA, P. Modifications of cell signalling in the cytotoxicity of metals. **Pharmacological Toxicology**. v.68, n.6, p.424-429, 1991.

- RYAN, P.B.; HUET, N.; MACINTOSH, D.L. Longitudinal investigation of exposure to arsenic, cadmium, and lead in drinking water. **Environ. Health Perspect.** v.108, n.8, p.731-735, 2000.
- SAMALI, A. & ORRENIUS, S. Heat shock proteins: regulators of stress response and apoptosis. **Cell Stress & Chaperones.** v.3, n.4, p.228-236, 1998.
- SAMET, J.M.; GRAVES, L.M.; QUAY, J.; DAILEY, L.A.; DEVLIN, R.B.; GHIO, A.J.; WU, W.; BROMBERG, P.A.; REED, W. Activation of MAPKs in human bronchial epithelial cells exposed to metals. **American Journal of Physiology.** v.275, p.551-558, 1998.
- SAMET, J.M.; SILBAJORIS, R.; WU, W.; GRAVES, L.M. Tyrosine phosphatases as targets in metal-induced signalling in human airway epithelial cells. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology.** v.21, p.357-364, 1999.
- SANDHIR, R. & GILL, K.D. Calmodulin and cAMP dependent synaptic vesicle protein phosphorylation in rat cortex following lead exposure. **International Journal of Biochemistry.** v.26, p.1383-1389, 1994.
- SANDHIR, R.; JULKA, D.; GILL, K. D. Lipoperoxidative damage on lead exposure in rat brain and its implications on membrane bound enzymes. **Pharmacology and Toxicology.** v.74, p.66-71, 1994.
- SCHILLACE, R.V. & SCOTT, J.D. Organization of kinases, phosphatases, and receptor signalling complexes. **Journal of Clinical Investigation.** v.103, p.761-765, 1999.
- SEGER, R. & KREBS, E.G. The MAPK signalling cascade. **FASEB Journal.** v.9, p.726-735, 1995.
- SEIMIYA, H.; MASHIMA, T.; YOHI, M.; TSURUO, T. c-Jun NH₂-terminal kinase-mediated activation of interleukin-1 β converting enzyme/CED-3-like protease during anticancer drug-induced apoptosis. **The Journal of Biological Chemistry.** v.272, p.4631-4636, 1997.
- SHARP, F.R.; MASSA, S.M.; SWANSON, R.A. Heat-shock protein protection. **Research News.** v.22, n.3, p.97-99, 1999.
- SILVA JÚNIOR, J.G. **Eletroforese de proteínas: guia teórico e prático.** Rio de Janeiro: Interciência, 2001, p.37-41.
- STOHS, S.J. & BAGCHI, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. **Free Radical Biology and Medicine.** v.18, p.312-336, 1995.
- STOHS, S.J.; BAGCHI, D.; HASSOUN, E.; BAGCHI, M. Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology.** v.19, p.201-213, 2001.
- STOLTENBURG-DIDINGER, G. Neuropathology of the hippocampus and its susceptibility to neurotoxic insult. **Neurotoxicology.** v.15, n.3, p.445-450, 1994.

- STORELLI, M.M. & MARCOTRIGIANO, G.O. Consumption of bivalve molluscs in Italy: estimated intake of cadmium and lead. **Food. Addit. Contam** v.18, n.4, p.303-307, 2001.
- STRUZYNSKA, L.; DABROWSKA-BOUTA, B.; RAFALOWSKA, U. Acute lead toxicity and energy metabolism in rat brain synaptosomes. **Acta Neurobiologia Experimentalis**. v.57, n.4, p.275-281, 1997.
- SUN, X.; TIAN, X.; TOMSIG, J.L.; SUSZKIW, J.B. Analysis of differential effects of Pb^{2+} on protein kinase C isozymes. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v.156, p.40-45, 1999.
- SUNDARESAN, M.; YU, Z.X.; FERRANS, V.J.; IRANI, K.; FINKEL, T. Requirement for generation of H_2O_2 for platelet-derived growth factor signal transduction. **Science**. v.270, p.296-299, 1995.
- SWEATT, J.D. The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. **Journal of Neurochemistry**. v.76, p.1-10, 2001.
- TAKENAKA, K.; MORIGUCHI, T.; NISHIDA, E. Activation of the protein kinase p38 in the spindle assembly checkpoint and mitotic arrest. **Science**. v.280, p.599-602, 1998.
- TANG, N. & ENGER, M.D. $Cd^{(2+)}$ -induced c-myc mRNA accumulation in NRK-49F cells is blocked by the protein kinase inhibitor H7 but not by HA1004, indicating that protein kinase C is a mediator of the response. **Toxicology**. v.81, p.155-164, 1993.
- TANOUE, T.; YAMAMOTO, T.; MAEDA, R. NISHIDA, E. A novel MAPK phosphatase MKP-7 acts preferentially on JNK/SAPK and p38 α and β MAPKs. **The Journal of Biological Chemistry**. v.276, p.26629-26639, 2001.
- TIFFANY-CASTIGLIONI, E. & QIAN, Y. Astroglia as metal depots: molecular mechanisms for metal accumulation, storage and release. **Neurotoxicology**. v.22, p.577-592, 2001.
- TROMBINI, T.V.; PEDROSO, C.G.; PONCE, D.; ALMEIDA, A.A.; GODINHO, A.F. Developmental lead exposure in rats: is a behavioural sequel extended at F2 generation? **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. v.68, n.4, p.743-751, 2001.
- UEHARA, T.; KANEKO, M.; TANAKA, S.; OKUMA, Y.; NOMURA, Y. Possible involvement of p38 MAP kinase in HSP70 expression induced by hypoxia in rat primary astrocytes. **Brain Research**. v.823, p.226-230, 1999.
- USAI, C.; BARBERIS, A.; MOCCAGATTA, L.; MARCHETTI, C. Pathways of cadmium influx in mammalian neurons. **Journal of Neurochemistry**. v.72, p.2154-2161, 1999.
- VALVERDE, M.; TREJO, C.; ROJAS, E. Is the capacity of lead acetate and cadmium chloride to induce genotoxic damage due to direct DNA-metal interaction? **Mutagenesis**. v.16, n.3, p.265-270, 2001.
- VERONESI, B. & EHRICH, M. Cell culture models of environmental chemical neurotoxicity. In. **Neurotoxicology in vitro**. Ed. by Taylor e Francis, 1999.

- VIG, P.J.S. & NATH, R. In vivo effects of cadmium on calmodulin and calmodulin regulated enzymes in rat brain. **Biochemistry International**. v.23, p.927-934, 1991.
- WAALKES, M.P. Cadmium carcinogenesis in review. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v.79, p.241-244, 2000.
- WALTON, J. Lead toxicity traced to mitochondria. **Medical Journal of Australia**. v.2, n.9, p.443, 1982.
- WANG, Y.Z. & BONNER, J.C. Mechanism of extracellular signal-regulated kinase ERK-1 and ERK-2 activation by vanadium pentoxide in rat pulmonary myofibroblasts. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**. v.22, p.590-596, 2000.
- WANG, K.L.; KHAN, M.T.; ROUFOGALIS, B.B. Identification and characterization of a calmodulin-binding domain in Ral-A, a Ras-related GTP-binding protein purified from human erythrocyte membrane. **The Journal of Biological Chemistry**. v.272, p.16002-16009, 1997.
- WEBSTER, W.S & VALOIS, A.A. The toxic effects of cadmium on the neonatal mouse CNS. **Journal of Neuropathology**. v.40, p.247-257, 1981.
- WILLIAMS, T.M.; NDIFOR, A.M.; NEAR, J.T.; REAMS-BROWN, R.R. Lead enhances NGF-induced neurite outgrowth in PC12 cells by potentiating ERK/MAPK activation. **Neurotoxicology**. v.21, n.6, p.1081-1089, 2000.
- WILSBACHER, J.L.; GOLDSMITH, E.J.; COBB, M.H. Phosphorylation of MAP kinases by MAP/ERK involves multiple regions of MAP kinases. **The Journal of Biological Chemistry**. v.274, n.24, p.16988-16994, 1999.
- WISDOM, R.; JOHNSON, R.S.; MOORE, C. c-Jun regulates cell cycle progression and apoptosis by distinct mechanisms. **EMBO Journal**. v.18, p.188-197, 1999.
- XIA, Z.; DICKENS, M.; RAINGEAUD, J.; DAVIS, R.J.; GREENBERG, M.E. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. **Science**. v.270, p.1326-1331, 1995.
- XU, X.; RABER, J.; YANG, D.; SU, B.; MUCKE, L. Dynamic regulation of c-Jun N-terminal kinase activity in mouse brain by environmental stimuli. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.94, p.12655-12660, 1997.
- YANG, D.D.; KUAN, C.Y.; WHITMARSH, A.J.; RINCON, M.; ZHENG, T.S.; DAVIS, R.J.; RAKIC, P.; FLAVELL, R.A. Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the JNK3 gene. **Nature**. v.289, p.865-870, 1997.
- YOSHIDA, S. Re-evaluation of acute neurotoxic effects of Cd²⁺ on mesencephalic trigeminal neurons of the adult rat. **Brain Research**. v.892, p.102-110, 2001.

- YU, R.; CHEN, C.; MO, Y.; HEBBAR, V.; OWUOR, E.D.; TAN, T.; KONG, A.T. Activation of mitogen-activated protein kinase pathways induces antioxidant response element-mediated gene expression via a Nrf2-dependent mechanism. **The Journal of Biological Chemistry**. v.275, n.51, p.39907-39913, 2000.
- ZHAO, W.; RUAN, D.Y.; XU, Y.Z.; CHEN, J.T.; WANG, M.; GE, S.Y. The effects of chronic lead exposure on long-term depression in area CA1 and dentate gyrus of rat hippocampus in vitro. **Brain Research**. v.818, p.153-159, 1999.
- ZIEGLER, E.E.; EDWARDS, B.B.; JENSEN, R.L.; MAHAFFEY, K.R.; FOMON, S.J. Absorption of the lead by infants. **Pediatrics**. v.12, p.29-34, 1978.

ANEXOS

Anexo 1 - Resumo dos dados obtidos nos experimentos para avaliação da viabilidade celular em fatias hipocâmpais de ratos jovens expostas ao chumbo e cádmio.

| Tratamentos | | Viabilidade Celular (%) | |
|---------------|-------------|-------------------------|-------------|
| | | 1 hora | 3 horas |
| Chumbo | | | |
| | 1 μ M | 97 \pm 13 | 82 \pm 20 |
| | 5 μ M | 97 \pm 10 | 84 \pm 17 |
| | 10 μ M | 92 \pm 11 | 76 \pm 12 |
| | 50 μ M | 98 \pm 14 | 80 \pm 27 |
| | 100 μ M | 90 \pm 12 | 76 \pm 17 |
| Cádmio | | | |
| | 5 μ M | 98 \pm 5 | 85 \pm 8 |
| | 10 μ M | 86 \pm 7 | 81 \pm 12 |
| | 50 μ M | 79 \pm 7 | 74 \pm 13 |
| | 100 μ M | 74 \pm 7* | 51 \pm 9* |
| | 200 μ M | 65 \pm 8* | 41 \pm 9* |

Resultados representam média em percentagem \pm erro padrão e são expressos como percentual do controle (considerado 100%). Chumbo, n = 8; cádmio, n = 4; * p < 0,05 em relação ao controle.

Anexo 2 - Resumo dos dados obtidos nos experimentos para avaliação da viabilidade celular com o inibidor de p38^{MAPK} SB203580 em fatias hipocâmpais de ratos jovens.

| Tratamentos | Viabilidade Celular (%) | |
|-------------------|-------------------------|--------------|
| | 1 hora | 1 + 2 horas |
| SB 5 μ M | 95 \pm 9 | 100 \pm 7 |
| SB 10 μ M | 91 \pm 9 | 100 \pm 6 |
| Cd 200 μ M | 75 \pm 2* | 79 \pm 5* |
| Cd + SB 5 μ M | 77 \pm 12* | 82 \pm 10* |
| Cd+SB 10 μ M | 79 \pm 12* | 83 \pm 6* |

Resultados representam média em percentagem \pm erro padrão e são expressos como percentual do controle (considerado 100%). n = 4; * p < 0,05 em relação ao controle.

Anexo 3 - Resumo dos resultados obtidos nos experimentos *in vitro* para avaliação da fosforilação de ERK1/2 em fatias hipocâmpais de ratos jovens.

| Tratamentos | P-ERK1/2 (%) | | | |
|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | 1 hora | | 3 horas | |
| | P-ERK1 | P-ERK2 | P-ERK1 | P-ERK2 |
| Chumbo | | | | |
| 1 μ M | 124 \pm 35 | 113 \pm 37 | 125 \pm 9 | 156 \pm 25 |
| 5 μ M | 150 \pm 27 | 161 \pm 26 | 134 \pm 10 | 180 \pm 33 |
| 10 μ M | 149 \pm 29 | 172 \pm 37 | 149 \pm 21* | 203 \pm 45 |
| 50 μ M | 161 \pm 50 | 128 \pm 14 | 147 \pm 12* | 192 \pm 33 |
| 100 μ M | 178 \pm 37 | 159 \pm 30 | 157 \pm 14* | 201 \pm 40 |
| Cádmio | | | | |
| 5 μ M | 89 \pm 25 | 100 \pm 26 | 92 \pm 7 | 97 \pm 13 |
| 10 μ M | 123 \pm 38 | 144 \pm 47 | 94 \pm 6 | 101 \pm 13 |
| 50 μ M | 150 \pm 40 | 153 \pm 26 | 124 \pm 16 | 135 \pm 24 |
| 100 μ M | 200 \pm 49 | 227 \pm 50* | 183 \pm 34* | 205 \pm 35* |
| 200 μ M | 405 \pm 91* | 366 \pm 72* | 288 \pm 43* | 293 \pm 43* |

Resultados representam média em percentagem \pm erro padrão e são expressos como percentual do controle (considerado 100%). n = 6; * p < 0,05 em relação ao controle.

Anexo 4 - Resumo dos resultados obtidos nos experimentos *in vitro* para avaliação da fosforilação de p38^{MAPK} em fatias hipocâmpais de ratos jovens.

| Tratamentos | | P-p38 ^{MAPK} (%) | |
|---------------|-------|---------------------------|-----------|
| | | 1 hora | 3 horas |
| Chumbo | | | |
| | 1μM | 174 ± 33 | 148 ± 13 |
| | 5μM | 178 ± 37 | 167 ± 25* |
| | 10μM | 177 ± 35 | 185 ± 25* |
| | 50μM | 158 ± 13 | 183 ± 19* |
| | 100μM | 133 ± 17 | 167 ± 24* |
| Cádmio | | | |
| | 5μM | 126 ± 22 | 150 ± 7* |
| | 10μM | 128 ± 27 | 150 ± 12* |
| | 50μM | 146 ± 16 | 170 ± 13* |
| | 100μM | 203 ± 40* | 196 ± 21* |
| | 200μM | 191 ± 33* | 190 ± 7* |

Resultados representam média em percentagem ± erro padrão e são expressos como percentual do controle (considerado 100%). n = 6; * p < 0,05 em relação ao controle.

Anexo 5 - Resumo dos dados obtidos nos experimentos para avaliação da viabilidade celular em fatias hipocâmpais de ratos adultos expostas ao chumbo e cádmio.

| Tratamentos | | Viabilidade Celular (%) | |
|---------------|-------------|-------------------------|-------------|
| | | 1 hora | 3 horas |
| Chumbo | | | |
| | 1 μ M | 92 \pm 6 | 92 \pm 4 |
| | 5 μ M | 89 \pm 7 | 95 \pm 5 |
| | 10 μ M | 91 \pm 6 | 97 \pm 11 |
| | 50 μ M | 88 \pm 5 | 90 \pm 6 |
| | 100 μ M | 85 \pm 8 | 90 \pm 6 |
| Cádmio | | | |
| | 5 μ M | 99 \pm 6 | 102 \pm 8 |
| | 10 μ M | 99 \pm 6 | 93 \pm 2 |
| | 50 μ M | 89 \pm 8 | 84 \pm 7* |
| | 100 μ M | 82 \pm 7 | 75 \pm 4* |
| | 200 μ M | 72 \pm 4* | 55 \pm 4* |

Resultados representam média em percentagem \pm erro padrão e são expressos como percentual do controle (considerado 100%). n = 6; * p < 0,05 em relação ao controle.

Anexo 6 - Resumo dos dados obtidos nos experimentos para avaliação da viabilidade mitocondrial em sinaptossomas de ratos adultos expostos ao chumbo e cádmio.

| Tratamentos | Viabilidade Sinaptossomal (%) | | | | | |
|---------------|-------------------------------|---------|---------|-----------|---------|----------|
| | Córtex | | | Hipocampo | | |
| | 20 min. | 40 min. | 60 min. | 20 min. | 40 min. | 60 min. |
| Chumbo | | | | | | |
| 1µM | 102 ± 4 | 108 ± 6 | 103 ± 4 | 106 ± 3 | 102 ± 5 | 110 ± 7 |
| 5µM | 104 ± 4 | 105 ± 6 | 102 ± 2 | 97 ± 7 | 91 ± 6 | 93 ± 3 |
| 10µM | 103 ± 5 | 102 ± 7 | 100 ± 5 | 96 ± 3 | 90 ± 7 | 96 ± 3 |
| 50µM | 87 ± 4* | 82 ± 7* | 75 ± 4* | 59 ± 8* | 62 ± 6* | 52 ± 5* |
| 100µM | 82 ± 5* | 64 ± 6* | 55 ± 3* | 54 ± 4* | 50 ± 5* | 46 ± 10* |

Resultados representam média em percentagem ± erro padrão e são expressos como percentual do controle (considerado 100%). Córtex, n = 8; hipocampo, n = 3; * p < 0,05 em relação ao controle.

Anexo 7 - Resumo dos resultados obtidos nos experimentos *in vivo* para avaliação da fosforilação de ERK1/2 em hipocampo de ratos jovens.

| Tratamentos | P-ERK1/2 (%) | |
|---------------|--------------|-----------|
| | P-ERK1 | P-ERK2 |
| Chumbo | | |
| 2 mg/Kg | 149 ± 12* | 133 ± 8* |
| 8 mg/Kg | 179 ± 20* | 153 ± 13* |
| 12 mg/Kg | 156 ± 21* | 133 ± 10* |
| Cádmio | | |
| 0,5 mg/Kg | 110 ± 8 | 113 ± 2 |
| 1 mg/Kg | 127 ± 19 | 123 ± 6* |
| 3 mg/Kg | 151 ± 23* | 132 ± 8* |

Resultados representam média em percentagem ± erro padrão e são expressos como percentual do controle (considerado 100%). n = 8; * p < 0,05 em relação ao controle.

Anexo 8 - Resumo dos resultados obtidos nos experimentos *in vivo* para avaliação da fosforilação de p38^{MAPK} em hipocampo de ratos jovens.

| Tratamentos | | P-p38 ^{MAPK} (%) |
|---------------|-----------|---------------------------|
| Chumbo | | |
| | 2 mg/Kg | 176 ± 20* |
| | 8 mg/Kg | 182 ± 19* |
| | 12 mg/Kg | 184 ± 35* |
| Cádmio | | |
| | 0,5 mg/Kg | 161 ± 18* |
| | 1 mg/Kg | 193 ± 28* |
| | 3 mg/Kg | 162 ± 18* |

Resultados representam média em percentagem ± erro padrão e são expressos como percentual do controle (considerado 100%). n = 8; * p < 0,05 em relação ao controle.